



**Universidade Nova de Lisboa  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Monitorização da Ocorrência de Parasitas intestinais numa  
população hospitalar de Crianças (0-10 anos), na ilha de  
Santiago, Cabo Verde**

**Livonilda da Luz Lopes Gomes**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
PARASITOLOGIA MÉDICA**

**OUTUBRO, 2017**



**Universidade Nova de Lisboa  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Monitorização da Ocorrência de Parasitas intestinais numa  
população hospitalar de Crianças (0-10 anos), na ilha de  
Santiago, Cabo Verde**

**Mestranda:** Livonilda da Luz Lopes Gomes

**Orientadora:** Investigadora Doutora Maria Luísa Lobo Costa

**Coorientadora:** Professora Doutora Olga Matos

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica.

## **Agradecimentos**

Sozinha, nunca conseguiria chegar até aqui, por isso, muito tenho de agradecer a quem me ajudou na realização deste projeto, dentro e fora do âmbito académico:

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me dado força para superar todos os obstáculos que apareceram ao longo deste trabalho.

À minha orientadora Doutora Maria Luísa Lobo Costa, pelo apoio, orientação prestada e motivação durante toda a investigação.

À professora Doutora Olga Matos, pela co-orientação desta dissertação, por me ter recebido como sua estudante e por todo o apoio prestado ao longo deste projeto.

Aos profissionais do Hospital Dr. Agostinho Neto que participaram neste projeto, nomeadamente à Dr.<sup>a</sup> Jéssica Ramos, Dr.<sup>a</sup> Ariane Badiane, à equipa do Serviço de Pediatria e a todos os funcionários do Laboratório Central do Hospital Agostinho Neto, pela forma como me receberam e proporcionaram o melhor ambiente para poder realizar este trabalho.

Aos alunos e encarregados de educação o meu obrigado por terem participado neste projeto.

À Daniela Alves, pela preciosa ajuda prestada na análise estatística dos resultados.

À minha família, por todo o apoio económico, pela paciência, pelo incentivo, pela força que sempre me prestaram ao longo de toda a minha vida académica. Vocês sempre serão minha maior fonte de inspiração, pois são os meus maiores exemplos de força, coragem e perseverança. Ao meu namorado Bruno Cordeiro, por ter caminhado ao meu lado, pela sua paciência, compreensão e ajuda prestada durante a elaboração da presente dissertação, especialmente, quando sacrificava os dias, as noites, os fins-de-semana e os feriados em prol da realização deste estudo.

Às minhas amigas, em especial Rosa Miguel e Geraldina Manjate, pelo apoio incondicional, por tudo que partilhamos e que vamos partilhar ao longo desta nossa longa caminhada.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado!

## Resumo

### **Monitorização da ocorrência de parasitas intestinais numa população hospitalar de crianças (0-10 anos), na Ilha de Santiago, Cabo Verde.**

**Livonilda da Luz Lopes Gomes**

As infeções parasitárias intestinais encontram-se entre as infeções mais frequentes a nível mundial, sendo as crianças em idade pré-escolar e escolar um dos principais grupos de risco da população. Estima-se que cerca de 3,5 mil milhões de indivíduos estejam infetados, e que cerca de 450 milhões se encontrem doentes. A distribuição e a prevalência das espécies de parasitas intestinais variam de região para região, afetando maioritariamente os países de baixa renda, com clima tropical ou subtropical e com baixo grau de saneamento.

O objetivo principal deste trabalho foi determinar a ocorrência de infeções parasitárias intestinais em crianças (sintomáticas e assintomáticas) dos 0 aos 10 anos, seguidas em ambulatório ou no internamento do Hospital Agostinho Neto (HAN), na cidade da Praia (Cabo Verde), e a sua relação com fatores sociodemográficos e clínicos.

No HAN, a recolha de dados clínicos, epidemiológicos, sociodemográficos e a colheita das amostras fecais, decorreram nos meses de novembro e dezembro de 2015, e janeiro de 2016, e no Laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), foi efetuado o diagnóstico parasitológico e molecular. Para a deteção de DNA dos seguintes parasitas: *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e do microsporídeo- *Enterocytozoon bienersi* foram utilizadas as técnicas de *nested*-PCR.

No presente estudo, no total das técnicas aplicadas, verificou-se que o número de crianças parasitadas foi bastante superior (74,0%) ao número de crianças não parasitadas (26,0%). Das espécies encontradas nas amostras fecais, *Blastocystis hominis* foi a espécie observada em maior percentagem (69.3%), seguida por *G. duodenalis* (10.7%), *E. bienersi* (5.3%), *Ascaris lumbricoides* (4.7%), *Entamoeba coli* (4%), *Hemynolepis nana* (3.3%), *Entamoeba histolytica/dispar* (2.7%), *Cryptosporidium* spp. (1.3%) e *Enteromonas hominis* e *Iodamoeba butschlii* (0.7% cada).

Os potenciais fatores de risco observados durante o estudo foram: idade, tipo de abastecimento de água e hábitos de defecação da criança.

Do total de crianças parasitadas constatou-se que 7,2% encontravam-se infetadas por rotavírus.

Os resultados e os dados epidemiológicos obtidos, neste estudo, reforçam a importância do diagnóstico e controlo das enteroparasitoses na população infantil de Cabo Verde.

**Palavras-chave:** crianças, microscopia ótica, *nested*-PCR, protozoários, helmintas.

## Abstract

### **Monitoring occurrence of intestinal parasites in a hospital of children population (0-10 years old), in Santiago Island, Cape Verde. Livonilda da Luz Lopes Gomes**

Intestinal parasitic infections are among the more frequent infections worldwide, being children in preschool and school ages one of main risk groups of the population. We estimate that around 3,5 billions of individuals are infected, and that around 450 million are ill. Distribution and prevalence of intestinal parasites' species vary from region to region, affecting mostly developing countries with tropical and subtropical climate and with low sanitation level.

The main objective of this study was to determinate the occurrence of parasitic intestinal infections in children (symptomatic and asymptomatic) from 0 to 10 years old, in ambulatory or as inpatient at Agostinho Neto Hospital (HAN), at Cidade da Praia (Cabo Verde), and their relation with socio-demographic and clinical factors.

In HAN, clinical data, epidemiological, socio-demographic and fecal samples collection took place during November and December 2015, and January 2016, and parasitological and molecular diagnosis was performed at the Laboratory of the Group of Opportunistic Protozoa / HIV and Others Protozoa of the Institute of Hygiene and Tropical Medicine (IHMT), in Lisboa, Portugal. DNA detection of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and microsporidia - *Enterocytozoon bieneusi* was performed applying applied nested-PCR techniques.

Taking into consideration the parasitological and molecular techniques applied, we observed that the number of parasitized children was quite superior (74,0%) to the number of non-parasitized children (26,0%). *Blastocystis hominis* was the predominant parasite found (69,3%), followed by *G. duodenalis* (10.7%), *E. bieneusi* (5.3%), *Ascaris lumbricoides* (4.7%), *Entamoeba coli* (4%), *Hymenolepis nana* (3.3%), *Entamoeba histolytica/dispar* (2.7%), *Cryptosporidium* spp. (1.3%) and *Enteromonas hominis* and *Iodamoeba butschlii* (0.7% each).

Potential risk factors observed during the study were: age, type of water supply and children's defecation habits.

Of the total of parasitized children, 7,2 were infected with rotavirus.

Results and epidemiological data obtained in this study reinforce the importance of diagnosis and control of enteroparasitoses in the infant population of Cabo Verde.

**Key words:** children, optical microscopy, nested-PCR, protozoa, helminthes.

# Índice

<b>1. Introdução</b>	1
1.1. Enquadramento teórico	1
1.2. Problemática e relevância do estudo	1
1.3. Enquadramento das parasitoses intestinais em Cabo Verde	3
1.4. Parasitas intestinais	5
1.4.1. Protozoários	5
1.4.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba díspar</i>	6
1.4.1.2. <i>Entamoeba coli</i> , <i>Entamoeba hartmanni</i> , <i>Entamoeba polecki</i> , <i>Endolimax nana</i> e <i>Iodamoeba bütschlii</i>	10
1.4.1.3. <i>Giardia duodenalis</i>	11
1.4.1.4. <i>Enteromonas hominis</i>	15
1.4.1.5. <i>Cryptosporidium</i> spp.	16
1.4.1.6. <i>Blastocystis hominis</i>	22
1.4.1.7. Microsporídeos	27
1.4.2. Helmintas	31
1.4.2.1. <i>Ascaris lumbricoides</i>	33
1.4.2.2. <i>Hymenolepis nana</i>	35
1.4.3. Outros agentes etiológicos que causam diarreia	37
1.4.3.1. Rotavírus	37
<b>1.5. Objetivos</b>	41
1.5.1. Objetivos Geral	41
1.5.2. Objetivos específicos	41
<b>2. Material e Métodos</b>	42
2.1. Local e desenho do estudo	42
2.2. População e amostra	42
2.3. Critérios de Inclusão	42
2.4. Ficha de colheita de dados (Questionário – Anexo B)	43
2.5. Considerações Éticas ou Legais (Anexo C) e Consentimento Livre e Esclarecido	43
2.6. Diagnóstico parasitológico e molecular	43

2.6.1. Colheita e conservação das amostras fecais-----	43
2.6. 2. Diagnóstico parasitológico-----	43
2.6.2.1. Concentração das amostras fecais-----	43
2.6.2.2. Exame direto com coloração por solução de Lugol-----	44
2.6.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen modificado (adaptado de Casemore <i>et al</i> , 1985) -----	44
2.6.3. Diagnóstico molecular-----	44
2.6.3.1. Extração de DNA-----	44
2.6.3.2. <i>nested</i> -PCR-----	45
2.6.3.2.1. Amplificação do gene $\beta$ -giardina-----	45
2.6.3.2.2. Amplificação de DNA genômico de <i>Cryptosporidium</i> spp. por <i>nested</i> -PCR do locus SSU rRNA-----	47
2.6.3.2.3. Amplificação de DNA genômico de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> ----	48
2.6.3.3. Visualização dos produtos de PCR-----	50
2.6.3.4. Purificação dos fragmentos amplificados por <i>nested</i> -PCR-----	50
-----	50
2.7. Diagnóstico para detecção de Rotavírus em amostras fecais-----	50
2.8. Definição de amostra positiva-----	51
2.9. Análise estatística dos Dados-----	51
<b>3. Resultados-----</b>	<b>52</b>
3.1. Caracterização sociodemográfica e clínica da população em estudo-----	52
3.2. Diagnóstico parasitológico e molecular-----	55
3.3. Infecção parasitária e fatores sociodemográficos e ambientais-----	60
3.4. Infecção parasitária e fatores clínicos-----	73
3.5. Infecção por rotavírus e fatores sociodemográficos e clínicos-----	76
<b>4. Discussão e Conclusões-----</b>	<b>78</b>
4.1. Discussão-----	78
4.2. Conclusões-----	99
4.3. Considerações finais e perspectivas futuras-----	102
<b>5. Referências Bibliográficas -----</b>	<b>103</b>
<b>6. Anexos -----</b>	<b>136</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de Cabo Verde-----	3
<b>Figura 2.</b> Trofozoíto e quisto de <i>Entamoeba histolytica</i> corados com tricrómio-----	7
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática de trofozoíto e quisto de <i>Giardia duodenalis</i> ----	13
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i> -----	14
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do oocisto de <i>Cryptosporidium andersoni</i> e esporozoíto de <i>Cryptosporidium parvum</i> -----	18
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.-----	19
<b>Figura 7.</b> Formas de desenvolvimento de <i>Blastocystis hominis</i> -----	24
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Blastocystis hominis</i> -----	25
<b>Figura 9.</b> Fotografia de microscopia eletrónica de transmissão da estrutura interna de um esporo de microsporídeo-----	28
<b>Figura 10.</b> Ciclo de vida dos microsporídeos-----	29
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática de ovos e de vermes adultos de <i>Ascaris lumbricoides</i> -----	33
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática de ovos e do verme adulto de <i>Hymenolepis nana</i> -----	36
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática do corte de uma partícula de rotavírus evidenciando a localização dos diferentes componentes virais-----	38
<b>Figura 14.</b> (A) Quisto de <i>Giardia duodenalis</i> , (B) Quisto de <i>Entamoeba coli</i> , (C e D) Quistos de <i>Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar</i> ; (E) Ovo de <i>Ascaris lumbricoides</i> e (F e G) Ovos de <i>Hymenolepis nana</i> -----	59
<b>Figura 15.</b> Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene $\beta$ -giardina de <i>Giardia duodenalis</i> por nested-PCR--	59
<b>Figura 16.</b> Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene SSU rRNA de <i>Cryptosporidium</i> spp. por nested-PCR-----	59
<b>Figura 17.</b> Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene ITS-rRNA de <i>Enterocytozoon bienersi</i> por nested-PCR-----	60



## Índice de Quadros

<b>Quadro 1.</b> Características dos oligonucleótidos iniciadores para a $\beta$ -giardina usados nas duas etapas de <i>nested</i> -PCR-----	46
<b>Quadro 2.</b> Sequência dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação de um fragmento do gene SSU rRNA e tamanho dos fragmentos amplificados-----	48
<b>Quadro 3.</b> Características dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação do gene ITS- rRNA por <i>nested</i> -PCR-----	49
<b>Quadro 4.</b> Dados sociodemográficos das crianças que participaram no estudo-----	53
<b>Quadro 5.</b> Dados clínicos das crianças que participaram no estudo-----	54
<b>Quadro 6.</b> Resultados do diagnóstico parasitológico e/ou molecular realizado às amostras fecais das 150 crianças estudadas-----	56
<b>Quadro 7.</b> Distribuição dos parasitas intestinais identificados por microscopia ótica e/ou PCR nas fezes das crianças estudadas-----	56
<b>Quadro 8.</b> Percentagem de crianças parasitadas por espécies de protozoários, helmintas e associação entre protozoários e helmintas-----	58
<b>Quadro 9.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o gênero e idade-----	60
<b>Quadro 10.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o grau de escolaridade dos encarregados de educação-----	60
<b>Quadro 11.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o tipo de casa-----	61
<b>Quadro 12.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com a conservação dos alimentos no frigorífico e com o tipo de abastecimento de água-----	61
<b>Quadro 13.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o destino de esgoto-----	62
<b>Quadro 14.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com a recolha de lixo-----	62
<b>Quadro 15.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas quanto aos hábitos de defecação-----	63
<b>Quadro 16.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas quanto á presença de animais domésticos em casa-----	63

<b>Quadro 17.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com as espécies de animais domésticos presentes nas habitações-----	63
<b>Quadro 18.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas por protozoários intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos-----	65
<b>Quadro 19.</b> Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas por helmintas intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos-----	66
<b>Quadro 20.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários intestinais não patogênicos de acordo com os fatores sociodemográficos-----	67
<b>Quadro 21.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por <i>Blastocystis hominis</i> de acordo com os fatores sociodemográficos-----	69
<b>Quadro 22.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por <i>Giardia duodenalis</i> de acordo com os fatores sociodemográficos-----	70
<b>Quadro 23.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp. de acordo com os fatores sociodemográficos-----	71
<b>Quadro 24.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por <i>Enterocytozoon bieneusi</i> de acordo com os fatores sociodemográficos-----	72
<b>Quadro 25.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção parasitária quanto à presença de sintomatologia-----	73
<b>Quadro 26.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção parasitária de acordo com os fatores clínicos-----	74
<b>Quadro 27.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários e helmintas intestinais de acordo com os fatores clínicos-----	75
<b>Quadro 28.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários intestinais não patogênicos de acordo com os fatores clínicos-----	75
<b>Quadro 29.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por rotavírus de acordo com a sintomatologia-----	77
<b>Quadro 30.</b> Distribuição das crianças com e sem infecção por rotavírus quanto à presença de infecção parasitária-----	77

## Índice de Gráficos

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição das crianças estudadas no Hospital Dr. Agostinho Neto por sexo e por idade-----	52
<b>Gráfico 2.</b> Sintomatologia presente nas crianças estudadas-----	55
<b>Gráfico 3.</b> Percentagem de crianças submetidas a desparasitação no ano que precedeu o estudo-----	55
<b>Gráfico 4.</b> Percentagem de crianças parasitadas e não parasitadas que participaram no estudo-----	56
<b>Gráfico 5.</b> Percentagem de protozoários, helmintas e associação entre protozoários e helmintas identificadas por microscopia ótica e/ou por <i>nested</i> - PCR nas crianças parasitadas que participaram no estudo-----	57
<b>Gráfico 6.</b> Percentagem das parasitoses intestinais identificadas por microscopia ótica e/ou por <i>nested</i> -PCR nas crianças estudadas-----	57
<b>Gráfico 7.</b> Percentagem de espécies de parasitas intestinais identificadas por microscopia ótica e/ou por <i>nested</i> -PCR nas crianças que participaram no estudo-----	58
<b>Gráfico 8.</b> Distribuição das crianças parasitadas por protozoários e helmintas intestinais de acordo com o sexo-----	64
<b>Gráfico 9.</b> Distribuição das crianças parasitadas por protozoários e helmintas intestinais de acordo com a idade-----	64
<b>Gráfico 10.</b> Distribuição das crianças parasitadas por protozoários não patogénicos de acordo com o sexo-----	64
<b>Gráfico 11.</b> Distribuição das crianças parasitadas por protozoários não patogénicos de acordo com a idade-----	64
<b>Gráfico 12.</b> Percentagem de infeção por rotavírus nas crianças estudadas-----	77

## **Lista de siglas, acrónimos, abreviaturas e símbolos**

**%**- Percentagem

**°C**- Grau Celsius

**18S rRNA** – Subunidade pequena do RNA ribossômico

**DNA**- Ácido desoxirribonucleico do inglês “*Desoxiribonucleic Acid (DNA)*”

**BSA**- Albumina de soro bovino, do inglês “*Bovine Serum Albumine*”

**CDC**- Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América, do inglês “*Centers for Disease Control and Prevention*”.

**CIE**- Contraímunoeletroforese

**Cél/mm<sup>3</sup>**- Células por milímetro cúbico

**cm**- centímetro

**CNEPS**- Comité Nacional de Ética em Pesquisa para a Saúde

**dATP**- 2’-desoxiadenosina 5’-trifosfato

**dCTP**- 2’-desoxicitidina 5’-trifosfato

**dGTP**- 2’-desoxiguanosina 5’-trifosfato

**dsRNA**- ácido ribonucleico de cadeia dupla

**DTN**- Doenças tropicais negligenciadas

**dTTP**- 2’-desoxitimidina 5’-trifosfato

**EDTA**- ácido etilenodiamina tetra-acético

**efl  $\alpha$** - fator de alongação, do inglês “*elongation factor*”

**ELISA**- “*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*”

**et al.**, “E outros”, da locução latina *et alii*

**EUA**- Estados Unidos da América

**FDA**- “*Food and Drug Administration*”

**gdh**- glutamato desidrogenase, do inglês “*Glutamate dehydrogenase*”

**GEA**- gastroenterite aguda

**GP60**- Glicoproteína de 60-kDa

**HAN**- Hospital Dr. Agostinho Neto

**HCl**- ácido clorídrico

**IDH**- Índice de desenvolvimento humano

**IFA**- Imunofluorescência, do inglês “*Assay imuno-fluorescence*”

**IFI**- imunofluorescência indireta, do inglês “*Indirect immunofluorescence*”

**IHMT**- Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**INECV**- Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde

**IPI**- Infecções parasitárias intestinais

**ITS rRNA**- Espaçadores internos transcritos, do inglês internal transcribed spacers, do operão nuclear do RNA ribossômico

**Kb**- Quilobase

**kDa**- Quilodalton

**Km<sup>2</sup>**- Quilometro quadrado

**Mb**- Milhões de pares de bases

**ME**- Microscopia Eletrônica

**MET**- Microscopia Eletrônica de Transmissão

**Mg**- Miligrama

**Mg/L**- Miligrama por Litro

**MgCl<sub>2</sub>**- Cloreto de magnésio

**ml**- Mililitro

**mm<sup>3</sup>**- Milímetro cúbico

**mM**- Milimolar

**MM**- Marcador de massa molecular

**min**- minutos

**NaClO<sub>4</sub>**- Perclorato de sódio

***Nested-PCR***- “*nested- Polimerase Chain Reaction*”

**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**- Sulfato de amônio

**NSP**- proteínas não estruturais, do inglês “*Non-structural Proteins*”

**OMS**- Organização Mundial de Saúde

**ONU**- Organização das Nações Unidas

**P**- Probabilidade

**PCR**- “*Polymerase Chain Reaction*”

**pH**- Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica de uma solução ( $\log [H^+]$ )

**pmol**- Picomole

**RFLP**-Análise de fragmentos de restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RNA<sub>m</sub>**- Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “*messenger Ribonucleic Acid*”

**rpm**- rotações por minuto

**rRNA**- Ácido ribonucleico ribossômico, do inglês “*ribosomal Ribonucleic Acid*”

**RT-PCR**- “*Real Time- Polymerase Chain Reaction*”

**RV**- Rotavírus

**Sida**- Síndrome de imunodeficiência adquirida

**sp.**- Gênero

**spp.**- Espécies

**SPSS**- “*Statistical Package for the Social Sciences*”

**SSU rRNA**- Subunidade pequena do RNA ribossômico, do inglês “*mitochondrial small subunit ribosomal RNA*”

**TAE** - Tampão tris-acetato-EDTA, do inglês “*Tris-acetate-EDTA buffer*”

**TBE**- Tampão tris-borato-EDTA

**TE**– Tampão tris-HCl-EDTA

**TCD4<sup>+</sup>**- Linfócitos T com receptores do agrupamento de diferenciação 4, do inglês “*cluster of differentiation 4*”

**tpi**- triose fosfato isomerase, do inglês “*triose phosphate isomerase*”

**Tris-HCl**- Tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico

**UNICEF**- “*United Nations Children’s Fund*”

**UV**- Ultravioleta

**VIH**- Vírus de Imunodeficiência Humana do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*” (HIV)

**VP6**- Proteína viral 6

**WHO**- “*World Health Organization*”

**$\beta$ -giardina**- Beta giardina

**$\mu\text{g}/\mu\text{l}$** - Micrograma por microlitro

**$\mu\text{l}$** - Micrólitro

**$\mu\text{m}$** - Micrómetro



# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento teórico

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são doenças infecciosas, sendo algumas crónicas, com origem em agentes etiológicos como protozoários, helmintas, vírus, bactérias, fungos e ectoparasitas (Mackey *et al.*, 2014). Estas doenças prevalecem nos países de clima tropical e subtropical e estão distribuídas por zonas rurais e urbanas carenciadas (condições sanitárias precárias, alimentação inadequada e falta de acesso aos sistemas de saúde pública) de países com baixa renda, afetando principalmente crianças e mulheres grávidas (Hotez & Pecoul, 2010; Mackey *et al.*, 2014; Boisson, *et al.*, 2015). As DTN são consideradas negligenciadas porque têm sido eliminadas e erradicadas, em grande parte, nos países desenvolvidos e persistem apenas nos países pobres, marginalizados e em áreas de conflito (Mackey *et al.*, 2014; WHO, 2016).

Além de causar sofrimento físico e emocional, estas doenças interferem na capacidade de trabalho das populações, impedindo o desempenho escolar, desenvolvimento económico das famílias e das comunidades, mantendo as pessoas num ciclo de pobreza e doença (Hotez *et al.*, 2014; Mackey *et al.*, 2014). As DTN são a causa de morte de mais de 500.000 pessoas no mundo por ano (Verrest & Dorlo, 2016).

A lista de doenças tropicais negligenciadas é extensa. Nesta tese serão abordadas as parasitoses intestinais.

## 1.2. Problemática e relevância do estudo

Infeções parasitárias intestinais (IPI) são causadas por protozoários e helmintas e estão entre as infeções mais frequentes a nível mundial (Elyana *et al.*, 2016; WHO 2016). Estima-se que cerca de 3,5 mil milhões de pessoas estejam infetados, e que cerca de 450 milhões estejam doentes, como consequência destas infeções. A maioria reside nos países com baixa renda, com clima tropical ou subtropical e com baixo grau de saneamento básico (Fallahi *et al.*, 2015; Forsell *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2016). A distribuição e a prevalência dessas doenças variam de região para região devido aos fatores ambientais, sociais e geográficos, sendo que em alguns países com baixa renda pode chegar a 90% (Fallahi *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016). A África subsariana, o

Sudeste Asiático, a China, o Sul da Índia e a América do Sul são zonas endêmicas de IPI (Chin *et al.*, 2016; Rop *et al.*, 2016).

Assim, o estudo da prevalência das várias infecções parasitárias constitui um pré-requisito não somente para formular estratégias de controlo apropriadas, mas também para prever os riscos que as comunidades estão sujeitas (Fallahi *et al.*, 2015). Estas estratégias deverão englobar não só a desparasitação das populações, mas também a promoção das condições de saneamento e higiene para que se previna a reinfeção (Luong, 2003). Uma maior prevalência pode estar associada a diversos fatores entre os quais, a precariedade ou ausência de saneamento básico, a contaminação fecal da água e dos alimentos consumidos, fatores socioculturais e o maior contacto com animais (Belo *et al.*, 2011).

Embora as IPI possam infetar todos os membros de uma população, é claro que existem grupos específicos que, por apresentarem maior suscetibilidade a infecções associada a múltiplos fatores, correm maior risco de morbilidade e mortalidade (Rop *et al.*, 2016). Um dos grupos de risco destas infecções é constituído por crianças em idade pré-escolar e escolar, devido a maior contacto com ambientes contaminados, às práticas de higiene precárias e ao seu sistema imunitário imaturo (Gonçalves *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016).

Estas infecções podem causar morbilidades como diarreia, vômitos, anemia, síndrome de má-absorção, diminuição do crescimento, atraso mental, irritabilidade, anorexia, e aumento de suscetibilidade a outras infecções, constituindo assim um grave problema de saúde pública (Matthys *et al.*, 2011; Saeed *et al.*, 2015; Kiani *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016). Nos países desenvolvidos, os agentes etiológicos como *Giardia duodenalis* têm sido considerados parasitas reemergentes, sobretudo em crianças que frequentam os jardins-de-infância (Ferson, 1997; Gurgel *et al.*, 2005).

Geralmente as IPI ocorrem silenciosamente como infecções crónicas, sendo que os indivíduos infetados são assintomáticos ou apresentam sintomatologia comum a outras infecções. Verificou-se que os indivíduos infetados por duas ou mais espécies de parasitas, poliparasitismo, estão associadas a altas taxas de mortalidade e este facto, aumenta a suscetibilidade dos doentes a outras infecções. Além disso, as consequências adversas dessas infecções podem repercutir-se negativamente no indivíduo adulto (Elyana *et al.*, 2016). As IPI podem causar complicações graves em doentes imunocomprometidos,

como os infetados por VIH, os transplantados e os doentes em hemodiálise (Kiani *et al.*, 2016).

Tendo em consideração os estudos realizados em países africanos com as mesmas condições climáticas, socioeconómicas, de saneamento básico, de acesso à água potável e medidas de boas práticas de higiene (Augusto *et al.*, 2009; Steenhard *et al.*, 2009), a problemática em estudo consiste em determinar a prevalência de parasitas intestinais no Hospital Dr. Agostinho Neto na Cidade da Praia, Cabo Verde, em crianças dos 0-10 anos de idade, e a sua relação com determinantes comportamentais como hábitos de higiene e saneamento básico.

### 1.3. Enquadramento das parasitoses intestinais em Cabo Verde

A República de Cabo Verde é um arquipélago localizado junto à Costa da África Ocidental, no oceano Atlântico, e tem uma extensão geográfica de 4033 Km<sup>2</sup>. O arquipélago de Cabo Verde é formado por dez ilhas, divididos em dois grupos distintos: o grupo Barlavento, onde constam as ilhas de Santo Antão, São Vicente, Santa Luzia, São Nicolau, Sal e Boa Vista e os ilhéus Raso e Branco; e o de Sotavento constituído pelas ilhas do Maio, Santiago, Fogo, Brava e os ilhéus Secos ou de Rombo. As ilhas são de origem vulcânica sendo a maioria montanhosa. O clima é tropical, seco, árido e semiárido, com duas estações bem distintas. A estação seca de dezembro a junho e a estação húmida de julho a outubro. A estação húmida corresponde normalmente ao período mais quente do ano (ONU, 2010).



**Figura 1:** Mapa de Cabo Verde.  
Adaptado de Google maps.

Cabo Verde apresenta uma população total de aproximadamente 491.875 habitantes, dos quais 39% são crianças e adolescentes com idade compreendida entre os 0-17 anos, representando assim este grupo um número considerável em termos proporcionais da população. A população de crianças em Cabo Verde tem a seguinte distribuição por faixa etária: 70.132 dos 0-6 anos, 85.502 dos 7-14 anos, 35.695 dos 15-17 anos (ONU, 2010). A cidade da Praia é o concelho com maior população urbana (97,1%) (INECV, 2010).

Dados referentes ao ano de 2011 indicam que 63,3% da população total tem acesso a saneamento básico e 88,7% a água potável. A taxa de alfabetização dos adultos é de 89,4% (UNICEFCV,2013). Em comparação com os países da África subsaariana, em Cabo Verde registaram-se progressos importantes no índice de desenvolvimento humano (IDH). Essa melhoria deve-se ao progresso de Cabo Verde nos cuidados primários de saúde, na alfabetização e aumento da esperança de vida. Apesar da redução significativa da pobreza em Cabo Verde, entre 2001 e 2007, aproximadamente 130.900 indivíduos são considerados pobres, o que representa 26,6% da população total.

Segundo o Ministério de Saúde, as principais causas de morte na população em geral entre 1991-1995, foram as doenças infecciosas e parasitárias. Contudo, notou-se o declínio dessas doenças devido à transição epidemiológica de países pobres para países em desenvolvimento médio (Ministério da Saúde, 2005). Um inquérito sobre a prevalência de parasitoses intestinais nas escolas e jardins-de-infância de Cabo Verde realizado em 2004-2005, pelo Ministério da Saúde em parceria com a OMS, demonstrou uma prevalência de helmintas de 49,2 %, em que *Ascaris lumbricoides* foi o parasita mais frequentemente encontrado, com 41.5% dos infetados com parasitas intestinais. Este inquérito demonstrou ainda que crianças com idades compreendidas entre 6-8 anos são as que possuem maior prevalência de parasitoses. Em 2012, Martins, Pires, & Dias, num estudo com crianças dos 2-12 anos de idade, na comunidade de Rincão de Santa Catarina, ilha de Santiago, obtiveram uma prevalência de 25% de *Endolimax nana*, 18% de *Entamoeba histolytica*, 14,7% de *Giardia duodenalis*, 7,7% de *Hymenolepis nana*, 2,1% de *Ascaris lumbricoides*, 0,9% de *Trichuris trichiuria* e 0,8% de *Enterobius vermicularis*.

O Ministério da Saúde de Cabo Verde (2009), tendo por objetivo a prevenção de doenças de transmissão fecal-oral, promove campanhas de divulgação, educação entre as comunidades, no sentido de motivar a adoção, pela população de medidas de prevenção e controlo, tais como: lavar as mãos antes de manipular os alimentos, antes de comer e depois de defecar; ferver ou desinfetar a água; cozer bem os alimentos; desinfetar os alimentos que se comem crus (frutas e legumes); depois de confeccionar os alimentos protege-los contra a contaminação; e tratamento adequado dos dejetos humanos e do lixo. Ainda que, nas últimas décadas, Cabo Verde tenha passado por modificações que melhoraram a qualidade de vida da população, e embora sejam regularmente implementadas campanhas de desparasitação da população com o objetivo de controlar

esse problema de saúde pública, as parasitoses intestinais são endêmicas em diversas regiões do país, daí que estudos exploratórios sobre a avaliação do impacto destas campanhas sejam necessários para medir a importância das mesmas sobre a saúde das crianças.

### 1.4. Parasitas intestinais

As parasitoses intestinais encontram-se entre as doenças parasitárias mais prevalentes no mundo (Rop *et al.*, 2016), sendo os protozoários e helmintas os principais agentes responsáveis por estas infeções. Os protozoários intestinais incluem microrganismos eucariotas unicelulares tais como amebas (e.g. *Entamoeba histolytica*), flagelados (e.g. *Giardia duodenalis*), ciliados (e.g. *Balantidium coli*), coccídeos (e.g. *Cryptosporidium hominis*) (Farthing, Cevallos & Kelly, 2009) e Microsporídeos (e.g. *Enterocytozoon bieneusi*) (Kiani *et al.*, 2016).

Os helmintas, por sua vez, podem ser classificados como nematodes, cestodes e trematodes (Harhay, Horton & Olliaro, 2010). Entre os nematodes destacam-se os geohelmintas (são helmintas que necessitam obrigatoriamente de um estágio no solo, para completar o seu ciclo de vida), onde as quatro principais espécies são *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (Brooker, Clements & Bundy, 2006; Gogoi & Yadav, 2016).

O impacto dos parasitas intestinais na saúde do indivíduo, depende do estado nutricional do hospedeiro, das espécies infetantes em causa, da coinfeção, por dois ou mais parasitas, e ainda da duração e intensidade da infeção (Harhay, Horton & Olliaro, 2010).

#### 1.4.1. Protozoários

Os protozoários são organismos microscópicos, unicelulares capazes de se multiplicar nos seres humanos, o que contribui para a sua sobrevivência. Têm uma distribuição mundial com grande incidência nas regiões tropicais e subtropicais e constituem uma importante causa de morbilidade e mortalidade (WHO, 2005; Farthing, Cevallos & Kelly, 2009). Atuam também como infeções oportunistas em doentes com VIH/SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), assim como em outros imunossuprimidos (Harhay, Horton & Olliaro, 2010).

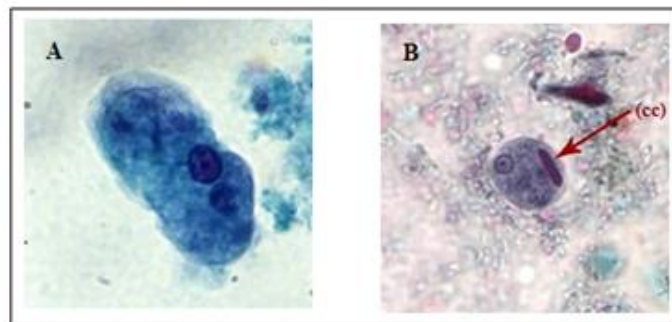
Os protozoários mais frequentes são: os flagelados patogênicos (*Giardia duodenalis* e *Dientamoeba fragilis*) e os não patogênicos (*Enteromonas hominis*, *Chilomastix mesnili* e *Pentatrichomonas hominis*), a ameba patogênica (*Entamoeba histolytica*) e as amebas não patogênicas (*Entamoeba dispar*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba büstschlii*), o ciliado patogênico (*Balantidium coli*), os coccídeos patogênicos (*Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cylospora cayetanensis* e *Cystoisospora belli*) (Norhayati *et al.*, 2003; Chacon- Cruz & Michell, 2009; Kiani *et al.*, 2016). Em geral, os dados sobre a gravidade da doença causada pelos protozoários intestinais são escassos, provavelmente devido ao desafio de um diagnóstico preciso (Speich *et al.*, 2016). Nesta dissertação, serão referidos de forma mais detalhada: *Entamoeba histolytica*, as amebas não patogênicas, *Giardia duodenalis*, *Enteromonas hominis*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis*, e os microsporídeos (*Enterocytozoon bieneusi*).

### 1.4.1.1. *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba díspar*

**Epidemiologia:** *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) é o agente etiológico da amebíase e foi descrito em 1875, em São Petersburgo, pelo médico russo Fiodor Lösch (Novak, Mastalska & Loster 2015). Durante muito tempo, o termo amebíase referia-se ao parasitismo humano (acompanhado ou não de manifestações clínicas) causado por *E. histolytica* e *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) que são duas espécies morfológicamente idênticas, mas que diferem em características bioquímicas, imunológicas, genéticas e epidemiológicas (Sargeunt *et al.*, 1978; Diamond & Clark, 1993). Estima-se que *E. histolytica*, agente causador da amebíase, infete 40 a 50 milhões de pessoas e seja causa de morte de cerca de 100.000 pessoas por ano, sendo considerada a segunda infecção parasitária mais letal em todo o mundo a seguir à malária (Emile, Bosco & Karine, 2013; Speich *et al.*, 2016). O complexo *E. histolytica/dispar* apresenta uma elevada prevalência no mundo nomeadamente em regiões tropicais e subtropicais. Na América Central e do Sul, Ásia e África as prevalências variam entre 1 a 40%, afetando populações com baixas condições de saúde pública e sem infraestruturas de saneamento básico, enquanto em países industrializados as prevalências variam entre 0,2 a 10,8% (Ibarra *et al.*, 2016).

**Morfologia:** ambas as espécies, *E. histolytica* e *E. dispar* podem ser encontradas no corpo humano, em duas formas: trofozoíto (polimórficos, com 12 a 60 µm de diâmetro)

ou forma vegetativa e quisto (esféricos ou ovais, com 10 a 15 µm de diâmetro) ou forma infecciosa. Os trofozoítos movimentam-se por pseudópodes e dividem-se assexuadamente por fissão binária (Figura 2A). Possuem um único núcleo, no qual o material genético encontra-se no cariossoma, localizado centralmente e a cromatina distribuída periféricamente (Novak, Mastalska & Loster 2015). Estas características morfológicas permitem a diferenciação entre trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* de outras amebas comensais (não patogênicas) que habitam o aparelho gastrointestinal dos seres humanos (Novak, Mastalska & Loster 2015). Os quistos apresentam uma parede constituída por quitina e podem conter até quatro núcleos com cariossomas localizados centralmente e cromatina distribuída periféricamente (Figura 2B) (Stanley, 2003).



**Figura 2:** (A) Trofozoíto de *E. histolytica* corado com tricrômio. (B) Quisto de *E. histolytica* corado com tricrômio, onde se pode observar os corpos cromatóides (cc) (seta vermelha). Adaptado de Novak, Mastalska & Loster 2015.

**Transmissão e ciclo de vida:** A transmissão ao ser humano ocorre por ingestão (via fecal-oral) de quistos infecciosos através das mãos, água e alimentos conspurcados com fezes contendo quistos do parasita e também pode ocorrer através de contacto sexual, onde não só os quistos são transmitidos, mas também os trofozoítos (Novak, Mastalska & Loster 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016; Jarrad *et al.*, 2016; Mi-ichi, Yoshida & Hamano, 2016; Müller *et al.*, 2016). Os hábitos culturais, a idade do hospedeiro, a existência de saneamento básico, a densidade populacional e o nível socioeconómico, são fatores que também influenciam o processo de transmissão deste parasita. Por outro lado, os quistos de *E. histolytica* são muito resistentes, capazes de sobreviver em condições ambientais adversas, ao pH ácido do estômago e à desinfecção da água com vários produtos químicos (Stanley 2003; Novak, Mastalska & Loster 2015; Mi-ichi, Yoshida & Hamano, 2016). *E. histolytica* completa o seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro, ou seja, o ciclo de vida é monoxénico (Novak, Mastalska & Loster 2015). Alguns trofozoítos diferenciam-se em

quistos que são excretados nas fezes através das quais contaminam água e alimentos. Geralmente os quistos são encontrados em fezes moldadas do hospedeiro, enquanto os trofozoítos são essencialmente encontrados em fezes diarreicas (Novak, Mastalska & Loster 2015; Mi-ichi, Yoshida & Hamano, 2016).

**Quadro clínico e sintomatologia:** para que os trofozoítos se tornem patogénicos primeiro têm que colonizar o cólon (no cego em contato com a mucosa e nas criptas glandulares). A presença de bactérias é essencial para a colonização, na medida em que criam um ambiente com baixa tensão de oxigénio e, provavelmente, fornecem outros suplementos metabólicos. Na maioria dos casos, os trofozoítos coexistem comensalmente no hospedeiro sem causar qualquer patologia intestinal (Halliez & Buret, 2015). No entanto, a amebíase pode variar de infeção assintomática (até 90% dos casos) a doença invasiva grave, sendo que apenas 10% das pessoas infetadas são sintomáticas (Ibarra *et al.*, 2016). Dependendo da suscetibilidade do hospedeiro infetado, a doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas: amebíase intestinal aguda (diarreia sanguinolenta com muco associada a dor abdominal e desidratação principalmente em crianças) (Novak, Mastalska & Loster 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016); amebíase intestinal crónica (queixas intermitentes de dores abdominais e diarreia sem sangue associada à perda de peso. Contudo, podem surgir complicações graves, incluindo megacólon, colite e perfuração intestinal) (Fernandes *et al.*, 2011; Halliez & Buret, 2015; Novak, Mastalska & Loster 2015); amebíase extraintestinal (outros órgãos são infetados por disseminação sistémica dos trofozoítos, e por sua vez causam abscessos hepáticos e pulmonares, lesões cerebrais, cutâneas e genitais) (Matthys *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015).

**Diagnóstico e tratamento:** O diagnóstico laboratorial da amebíase, consoante o tipo de amostra biológica, baseia-se em métodos parasitológicos, onde se inclui o exame direto (deteção e visualização do parasita por microscopia) e indireto (meios de cultura *in vitro*), métodos sero-imunológicos (deteção de antigénios e anticorpos), métodos moleculares (deteção de DNA parasitário) e métodos bioquímicos (análise isoenzimática) (Novak, Mastalska & Loster 2015).

**Exame Parasitológico direto:** consiste na visualização em microscópio ótico de quistos e trofozoítos, quer em fezes diarreicas quer em fezes moldadas. Após a concentração das



amostras fecais (por exemplo: método de Ritchie modificado), seguida de coloração com solução de Lugol efetua-se o exame a fresco das referidas amostras. Adicionalmente pode-se realizar a coloração permanente, pelo método de hematoxilina férrica ou tricrômio. Em amostras obtidas por exame proctológico (raspagem, líquido de aspiração do abscesso hepático e biópsias de úlceras), para pesquisa de trofozoítos, efetua-se o exame a fresco e após coloração permanente (Fotedar *et al.*, 2007; Novak, Mastalska & Loster, 2015). Este método não permite diferenciar *E. histolytica* (patogénica) de amebas não patogénicas e apresenta uma sensibilidade de cerca de 60%, que baixa no caso de um técnico com pouca experiência (Tanyuksel, 2003; Novak, Mastalska & Loster, 2015).

Exame Parasitológico indireto: o isolamento do parasita em meios de cultura *in vitro* (cultura axénica) é utilizado para estudos metabólicos, de patogenicidade e para produção de antígenos para o serodiagnóstico. As amostras biológicas para cultura podem ser fezes ou líquido aspirado em abscessos hepático (Fotedar *et al.*, 2007; Novak, Mastalska & Loster, 2015).

Métodos sero-imunológicos: baseiam-se na deteção de antígenos parasitários nas fezes e de anticorpos anti-*E. histolytica* no soro do hospedeiro (Santos *et al.*, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015; Akhtar *et al.*, 2016;). Teste de aglutinação indireta (IHA), Contraímunoelctroforese (CIE) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), apresentam maior sensibilidade (80-85%) e especificidade (95%) comparativamente com microscopia (Fotedar *et al.*, 2007). ELISA é o método mais utilizado, uma vez que é de fácil execução e permite testar um grande número de amostras, porém, não permite determinar com exatidão o tempo da infeção (Fotedar *et al.*, 2007; Novak, Mastalska & Loster 2015).

Métodos moleculares: o diagnóstico baseia-se na deteção de DNA parasitário em diversas amostras biológicas. Atualmente têm vindo a ser utilizadas técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, a *nested*-PCR (nPCR) e a real time-PCR (RT-PCR) tendo como sequências alvo diferentes genes do parasita, incluindo o gene 18S rRNA e SSU rRNA para a deteção e diferenciação de *E. histolytica*, de *E. dispar* e *E. moshkovskii* em fezes humanas (Fotedar *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013; Raza, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015; Akhtar *et al.*, 2016; Plutzer & Karanis, 2016). Estes métodos apresentam maior sensibilidade (94%) e especificidade (100%) para o

diagnóstico da amebíase humana, e permitem a distinção entre a espécie *E. histolytica* de *E. dispar* ou *E. moshkovskii* não patogénicas para o ser humano. No entanto, devido ao seu elevado custo e ao facto de exigir equipamento de laboratório adequado (por exemplo, termociclador), os métodos de biologia molecular são utilizados apenas em centros científicos e outras unidades altamente especializadas (Fotedar *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015; Akhtar *et al.*, 2016).

Métodos bioquímicos (análise isoenzimática): baseia-se na comparação das isoenzimas hexoquinase e fosfoglucomotase que permite a distinção entre *E. histolytica* e *E. dispar*. No entanto este método é complexo, moroso dispendioso, e necessita de pessoal qualificado para sua execução (Fotedar *et al.*, 2007; Novak, Mastalska & Loster 2015).

**Tratamento:** O tratamento da amebíase depende de vários fatores, incluindo o tipo de amebíase (intestinal ou extraintestinal), a presença ou ausência de abscessos nos órgãos e a idade do hospedeiro. O metronidazol, a cloroquina ou o tinidazol são os fármacos de primeira escolha no tratamento da amebíase, seguindo-se a administração de paramomicina, com o objetivo de erradicar os quistos presentes no cólon do hospedeiro (Santos *et al.*, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015; Jarrad *et al.*, 2016). Ocasionalmente pode ser necessário efetuar uma intervenção cirúrgica nos casos em que ocorre agravamento da doença (megacólon e infeções extraintestinais). Após o tratamento recomenda-se a realização de exames parasitológicos das fezes, de forma a avaliar a eficácia da terapêutica, uma vez que já foram descritos casos de resistência de *E. histolytica* para alguns fármacos (Novak, Mastalska & Loster 2015).

### **1.4.1.2. *Entamoeba coli* (*E. coli*), *E. hartmanni*, *E. polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii***

**Epidemiologia:** *Entamoeba coli* (*E. coli*), *E. hartmanni*, *E. polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba bütschlii* são geralmente considerados microrganismos não patogénicos e habitam no intestino grosso do hospedeiro humano (Fotedar *et al.*, 2007; Raza, 2013; Plutzer & Karanis, 2016).

**Morfologia:** As principais características morfológicas das espécies de amebas não patogénicas são: *Entamoeba coli* (trofozoíto: 20–25µm; um núcleo com cariossoma

descentrado; quisto: 15–25 µm, 8 núcleos); *Entamoeba hartmanni* (Trofozoíto: 8–10 µm, um núcleo com cariossoma central; Quisto: 6–8 µm, 4 núcleos); *Entamoeba polecki* (Trofozoíto: 15–20 µm e um núcleo com cariossoma central; Quisto: 10–15 µm, um núcleo); *Endolimax nana* (trofozoíto: 8-10 µm, um núcleo com cariossoma central; Quisto: 6-8 µm, 4 núcleos); *Iodamoeba büstschlii* (trofozoíto: 12-15 µm; Quisto: 10-12 µm, têm um grande vacúolo com glicogénio e apresentam, apenas, um núcleo) (Sargeant & Williams, 1979; Fotedar *et al.*, 2007).

**Transmissão e ciclo de vida:** A transmissão das amebas não patogénicas ocorre após a ingestão de quistos maduros, através das mãos, água e alimentos contaminados com os quistos dos parasitas (Müller *et al.*, 2016). Os quistos são capazes de sobreviver às condições ácidas do estômago e do duodeno e passam a colonizar o intestino grosso e posteriormente migram para o intestino delgado onde ocorre a desenquistação (CDC, 2016).

**Quadro clínico e sintomatologia:** As espécies de *Entamoeba* descritas como sendo não patogénicas são considerados organismos comensais ou formas não-invasivas, não causando sintomatologia ao hospedeiro infetado (Santos *et al.*, 2013).

**Diagnóstico e tratamento:** Por exame direto, com base nas características morfológicas dos quistos/trofozoítos nas amostras fecais do hospedeiro através da microscopia ótica ou por PCR (Santos *et al.*, 2013). Não é indicado tratamento específico para as espécies de *Entamoeba* consideradas não patogénicas (Santos *et al.*, 2013; Novak, Mastalska & Loster 2015).

### 1.4.1.3. *Giardia duodenalis* (Sinónimo de *Giardia lamblia* e *Giardia intestinalis*)

**Epidemiologia:** *Giardia duodenalis* (*G. duodenalis*) é um protozoário flagelado que parasita o aparelho gastrointestinal dos mamíferos, inclusive dos seres humanos, sendo responsável por causar giardíase, que afeta principalmente crianças de países com baixa renda (Thompson, 2000; Thompson, 2004; Andrade *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2016). Foi observado pela primeira vez por Anthony Van Leeuwenhoek, em 1681, que verificou estar ele próprio infetado. No entanto, foi o Vilem Lambl que fez a primeira descrição do flagelado, em 1859 (Tompson, 2000). A prevalência de *G. duodenalis* nos países em desenvolvimento é de 20% a 30%, ao contrário dos países desenvolvidos, que apresentam

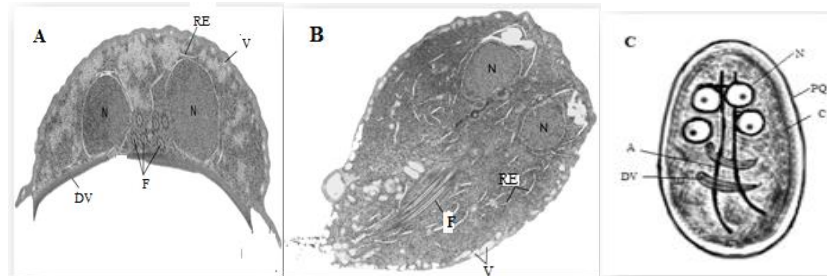
uma prevalência compreendida entre 3% a 7% (Ibarra *et al.*, 2016; Speich *et al.*, 2016). É também encontrada com frequência em animais domésticos, principalmente em cães, gatos e gado (Thompson, 2000).

Com base em características genéticas, identificadas a partir de amplificação de DNA de *G. duodenalis* por PCR, em associação com a técnica de análise de fragmentos de restrição, do inglês *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) e sequenciação dos produtos de PCR resultantes e dados de eletroforese enzimática, permitiram a classificação de oito *Assemblages* (A-H) com características epidemiológicas distintas, contudo morfologicamente indistinguíveis (Heyworth, 2016). Os dois principais *Assemblages* (A e B), compreendem parasitas capazes de infetar um grande número de animais domésticos e selvagens, para além do homem, evidenciando assim o potencial zoonótico (Morrison *et al.*, 2007; Heyworth, 2016). Os estudos recentes sugerem que a clarificação da heterogeneidade genética descrita em *Giardia*, passe por uma análise de genotipagem multilocus (MLG). Só a aplicação sistemática do diagnóstico e caracterização molecular a estudos epidemiológicos bem delineados permitirá avaliar importância da transmissão zoonótica na epidemiologia da giardíase humana, assim como de toda a dinâmica da transmissão da infeção por *Giardia* associada aos diversos fatores socioeconómicos e geográficos (Feng & Xiao, 2011).

**Morfologia:** *Giardia duodenalis* durante o seu ciclo de vida apresenta duas formas: o trofozoíto e o quisto infeccioso. A forma de trofozoíto (10-20µm de comprimento por 5-15µm de largura), é a forma móvel do parasita (Rajurkar *et al.*, 2012) (Figura 3). Movimentam-se por intermédio de quatro pares de flagelo e dividem-se de modo assexuado, por fissão binária. Para além dos quatro pares de flagelos, os trofozoítos possuem dois núcleos, dois axonemas (feixes de fibras longitudinais) e dois corpos em forma de vírgulas (corpos medianos), de função desconhecida. Na superfície ventral há um disco de adesão (ventral), responsável pela fixação do protozoário às células epiteliais do intestino. O habitat dos trofozoítos é o intestino delgado sendo por vezes encontrados nos ductos biliares e na vesícula biliar (Rajurkar *et al.*, 2012).

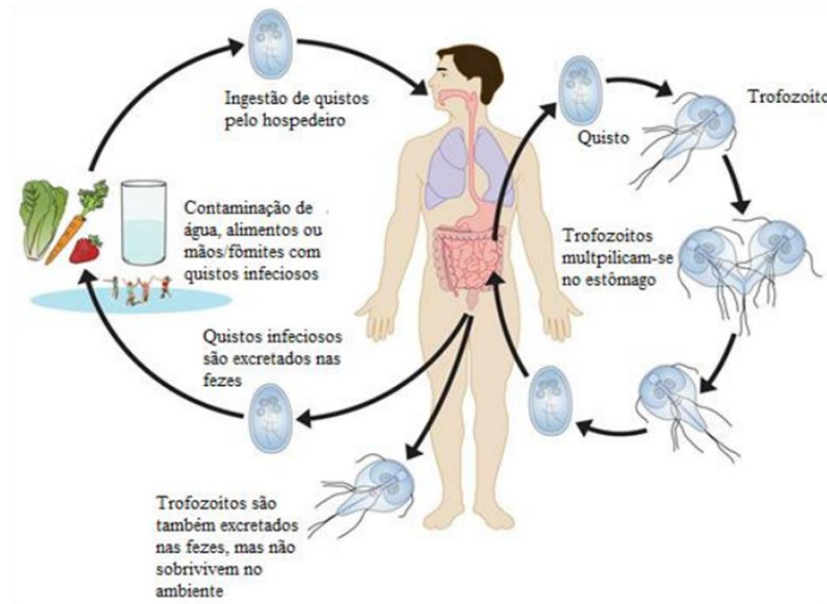
O quisto (11-14 µm de comprimento por 7-10 µm de largura), forma de resistência do parasita e infetante para os hospedeiros. No interior do quisto são visíveis dois a quatro núcleos (dependendo se a divisão nuclear ocorreu e se foi completa), quatro axonemas, quatro corpos médios, disco adesivo (ventral) e flagelos (Adam, 2001; Rajurkar *et al.*,

2012) (Figura 3). Contudo estão ausentes alguns organelos dos eucariotas, como mitocôndrias e complexo de golgi. O papel da mitocôndria é desempenhado pelo mitossoma (Tovar *et al.*, 2003).



**Figura 3:** (A) representação esquemática de trofozoíto de *Giardia* em seção/corte longitudinal onde se pode observar os núcleos (N), retículo endoplasmático (RE), flagelos (F), vacúolos (V) e disco ventral (DV). (B) representação esquemática de trofozoíto *Giardia* em seção/ corte transversal onde se pode observar os núcleos (N), flagelos (F), vacúolos (V) e retículo endoplasmático (RE). (C) representação esquemática do quisto de *Giardia* em corte transversal onde se encontra os núcleos (N), axonemas (A) a parede quística (PQ), o citoplasma (C) e o disco ventral (DV). Adaptado de Adam, 2001.

**Transmissão e ciclo de vida:** Os quistos são bastante resistentes às condições adversas do ambiente, permanecendo viáveis no ambiente e na água tratada com cloro por até 3 meses, facilitando deste modo a transmissão. *Giardia duodenalis* é transmitida diretamente pela via fecal-oral, principalmente em crianças que frequentam os infantários/jardins-de-infância onde as práticas de higiene são precárias, ou indiretamente pela ingestão de alimentos e água contaminados com quistos (Halliez & Buret, 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016; Ibarra *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016). A transmissão sexual também já foi descrita, nomeadamente em indivíduos que praticam sexo oral-anal (Rajurkar *et al.*, 2012). O ciclo de vida de *G. duodenalis* está resumido na Figura 4.



**Figura 4:** Representação esquemática do ciclo de vida de *G. duodenalis*.

Adaptado e modificado de Esch & Petersen, 2013.

**Quadro clínico e sintomatologia:** A infecção por *G. duodenalis* causa uma diversidade de quadros clínicos no hospedeiro que pode incluir desde a ausência de sintomatologia, a diarreia aguda, dores abdominais, vômitos, e diarreia crônica, principalmente nos doentes imunocomprometidos (como é o caso dos indivíduos seropositivos para VIH) (Ghenghesh *et al.*, 2016). A diarreia crônica associa-se frequentemente à síndrome de má absorção intestinal (fezes fétidas, flatulência, distensão abdominal), anorexia, perda de peso e anemia (Fernandes *et al.*, 2011; Halliez & Buret, 2015; Müller *et al.*, 2016). Em crianças, principalmente dos países com baixa renda, a giardíase causa deficiências nutricionais (deficiência de vitamina A, má absorção de vitamina B12) que pode levar a sérios danos nos órgãos e consequentemente à morte (Matthys *et al.*, 2011; Einarsson, Ma'ayeh & Svard, 2016). Para além dos sintomas agudos gastrointestinais, as infecções causadas por *G. duodenalis*, também podem dar origem a manifestações clínicas extraintestinais que incluem patologias oculares, artrite, atraso no desenvolvimento físico e cognitivo nas crianças e síndrome de fadiga crônica (Halliez & Buret, 2015).

**Diagnóstico e tratamento:** O método convencional para a deteção e identificação de quistos de *G. duodenalis* (nas fezes moldadas) e de trofozoítos (nas fezes diarreicas) é a microscopia, que é realizada com o auxílio de técnicas de concentração e coloração (como por exemplo: tricrómio e solução de Lugol), que evidenciam os quistos e os trofozoítos,

aumentando assim a probabilidade de detecção e identificação (Garcia & Shimizu, 1997; Schuurman *et al.*, 2007; Karadam, Ertuğ & Ertabaklar, 2015). A observação microscópica é muito útil, sobretudo nos países de baixa renda, uma vez que é de fácil utilização, não é dispendiosa, e possibilita a detecção simultânea de outros parasitas. Contudo, apresenta algumas desvantagens nomeadamente baixa sensibilidade, assim como a necessidade de um profissional devidamente treinado (Garcia & Shimizu, 1997, Karadam, Ertuğ & Ertabaklar, 2015). Por outro lado, é necessário a visualização de mais do que uma amostra de fezes por doente, recolhidas em dias alternados, uma vez que a excreção dos trofozoítos e quistos pode ser intermitente.

Atualmente é possível efetuar técnicas de imunodiagnóstico para a detecção de antígeno do parasita (ELISA e IFA), que apresentam maior sensibilidade comparativamente à microscopia, bem como técnicas de diagnóstico molecular, tais como a PCR, RFLP e a sequenciação de DNA, possibilitam a caracterização molecular dos isolados de amostras clínicas e ambientais, para identificação do parasita (Thompson, 2004; Karadam, Ertuğ & Ertabaklar, 2015; Rasmussen *et al.*, 2015). Os genes de SSU rRNA e genes que codificam a produção de glutamato desidrogenase (gdh), triose fosfato isomerase (tpi), beta giardina ( $\beta$  giardina) e fator de elongação 1  $\alpha$  (efl  $\alpha$ ) são alguns marcadores moleculares utilizados em estudos de caracterização molecular de *Giardia* (Shith *et al.*, 2006). As técnicas moleculares são altamente sensíveis, específicas e de fácil interpretação (Mahbubani *et al.*, 1992; Mcglade *et al.*, 2003).

Quanto ao tratamento os derivados de nitroimidazóis (metronidazol, ornidazol, tinidazol e nimorazol) são os principais fármacos utilizados no tratamento da giardíase, tanto em crianças como em adultos, contudo podem apresentar alguns efeitos colaterais (nomeadamente danos no DNA) e por isso são contraindicados durante a gravidez (Einarsson, Ma'ayeh & Svard, 2016; Jarrad *et al.*, 2016). Outras alternativas aos nitroimidazóis são o albendazol e a furazolidona (Gardner & Hill, 2001).

#### **1.4.1.4. *Enteromonas hominis* (*E. hominis*)**

**Epidemiologia:** *Enteromonas hominis* é um protozoário flagelado não patogénico que infecta o aparelho gastrointestinal dos seres humanos e outros mamíferos. É cosmopolita, no entanto, estima-se que a sua prevalência nos homens é cerca de 0,2-0,8% (CDC, 2016).

**Morfologia:** Os quistos de *E. hominis* são alongados ou ovais, medindo entre 6 a 8 µm. Podem ter um, dois ou quatro núcleos, sendo que as formas binucleadas são as mais comuns. Os trofozoítos são as formas vegetativas de *E. hominis*, medem cerca de 10 µm e apresentam apenas um núcleo e quatro flagelos (CDC,2016).

**Transmissão e ciclo de vida:** A transmissão de *E. hominis* ocorre após a ingestão de quistos infecciosos, através das mãos, água e alimentos contaminados com os quistos do parasita (CDC,2016). Após ingestão pelo hospedeiro humano, os quistos passam a colonizar o intestino grosso e posteriormente migram para o intestino delgado onde ocorre o desenquistamento. Os trofozoítos são libertados e diferenciam-se posteriormente em quistos que são excretados nas fezes juntamente com alguns trofozoítos (CDC,2016).

**Quadro clínico e sintomatologia:** *Enteromonas hominis* é considerado um parasita comensal, não causando qualquer sintomatologia ao hospedeiro infetado (CDC, 2016).

**Diagnóstico e tratamento:** *E. hominis* é identificado através da detecção de quistos e/ou trofozoítos nas amostras de fezes e não há recomendação de tratamento para este parasita (CDC, 2016).

### 1.4.1.5. *Cryptosporidium* spp.

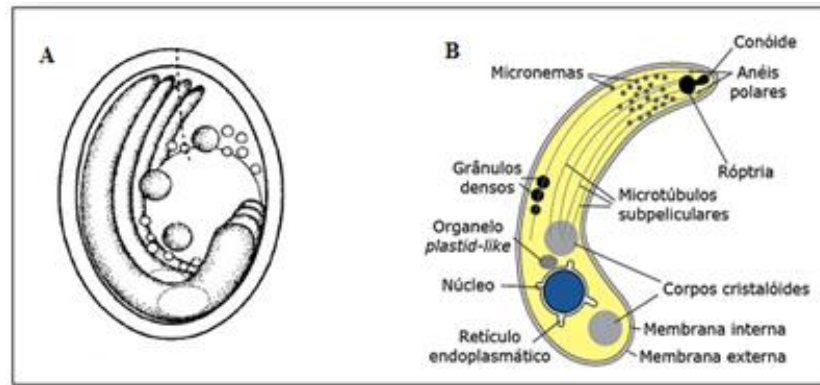
**Epidemiologia:** Os protozoários do género *Cryptosporidium* compreendem organismos eucariotas intracelulares obrigatórios (Fayer *et al.*, 2000; Fayer, 2008) pertencentes ao filo Apicomplexa. Infetam o aparelho gastrointestinal e pulmões de mamíferos, incluindo os humanos (Halliez & Buret, 2015; Painter *et al.*, 2015). Baseando-se na morfologia dos oocistos, locais de infeção, especificidade de hospedeiros e diferenças genéticas, o género *Cryptosporidium* atualmente é constituído por várias espécies, embora o seu número exato ainda não esteja definido, variando consoante o autor (Egyed *et al.*, 2003). As espécies mais bem caracterizadas incluem *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*), *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. canis*, *C. muris*, *C. felis*, *C. suis*, *C. wairi*, *C. meleagridis*, *C. baileyi* e *C. galli*, *C. varanii*, *C. serpentis*, *C. molnari* e *C. scophthalmi* (Morgan-Ryan *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2004; Xiao & Cama, 2006; Smith & Nichols, 2007; Fayer, 2010; Putignami & Menichella, 2010). As espécies conhecidas por causar infeções nos humanos são: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* e *C. andersoni*. Sendo que *C. hominis* e *C. parvum* são os responsáveis pela



maioria de casos de criptosporidiose humana, tanto em indivíduos imunocompetentes como em indivíduos imunocomprometidos (Xiao *et al.*, 2000; Jex & Gasser, 2010; Xiao, 2010; Halliez & Buret, 2015; Painter *et al.*, 2015). Contudo *C. hominis* parece estar limitado aos seres humanos, mas *C. parvum* pode infectar humanos e outras espécies de animais incluindo o gado (Halliez & Buret, 2015).

A criptosporidiose é considerada uma das infecções entéricas mais frequentes em seres humanos, principalmente em crianças, embora os adultos sejam também acometidos (Squire & Ryan, 2017). É uma doença endêmica, com eventuais surtos epidêmicos. A criptosporidiose ganhou grande destaque a partir dos primeiros casos descritos em indivíduos imunocomprometidos portadores da síndrome de imunodeficiência (sida) no final da década de 1970 (Fayer, 2004). A prevalência de criptosporidiose nos países de baixa renda é 2 a 15 vezes maior do que nos países industrializados. Esta diferença pode ser atribuída a uma melhor higiene entre os habitantes e a prevenção da contaminação de alimentos e água por oocistos nos países industrializados (Osman *et al.*, 2016).

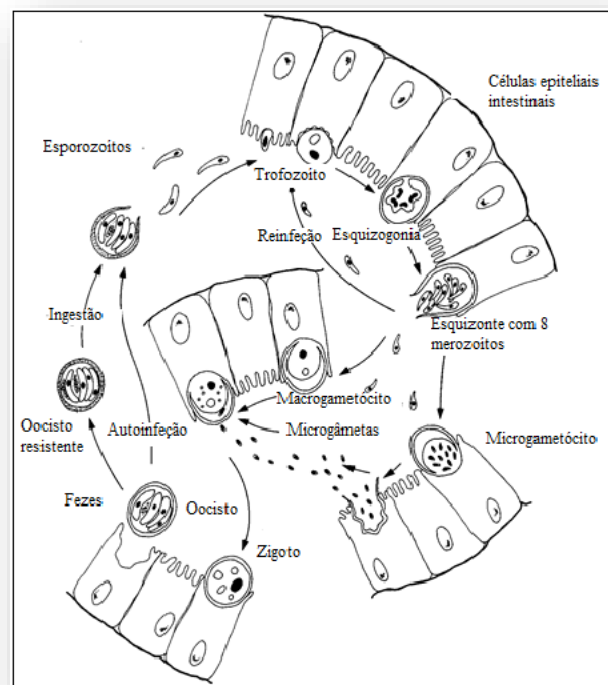
**Morfologia:** O oocisto, a forma de desenvolvimento transmissível das espécies do género *Cryptosporidium* apresenta uma forma esférica e oval com um diâmetro variável entre 2-6 µm (Fayer & Ungar, 1986; O' Donoghue, 1995; Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.* 2002; Ramirez *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005; Smith & Nichols, 2007). Os oocistos de *C. hominis* e *C. parvum* são idênticos, contêm quatro esporozoítos (Figura 5A) e podem ser de dois tipos: de parede espessa e de parede fina (Fayer, 2004, Smith *et al.*, 2005) (Figura 5B). As suas dimensões variam entre 3,8 a 5,2 x 0,5 a 1,2 µm (Smith & Nichols, 2007; Borowski *et al.*, 2010). Dos vários organelos que possuem, como se pode observar na Figura 5B, destacam-se o complexo apical do qual fazem parte os anéis polares apicais, a região conóide e os organelos secretórios necessários à invasão celular: os grânulos densos, os micronemas e uma única rôptria, os corpos cristaloides, o retículo endoplasmático, um organelo *plastid-like* e o núcleo no terço da extremidade posterior (Fayer & Ungar, 1986; Tetley *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2005; Fayer, 2008).



**Figura 5:** Formas de desenvolvimento de *Cryptosporidium* spp. **A-** Representação esquemática do oocisto de *C. andersoni* (adaptado de Lindsay *et al.*, 2000). **B-** Representação esquemática do esporozoíto de *C. parvum*. Adaptado e modificado de Smith *et al.*, 2005.

**Transmissão e ciclo de vida:** *Cryptosporidium* spp. apresenta duas vias principais de transmissão fecal-oral: a direta que ocorre através do contacto direto com animais infetados (transmissão zoonótica) ou pessoas (transmissão antroponótica) infetadas; e a indireta em que a infeção advém do consumo de água e/ou alimentos contaminados (Halliez & Buret, 2015; Shimelis, Tassachew & Lambiyo, 2016) ou do transporte mecânico dos oocistos através de vetores (Fayer *et al.*, 2000; Dillingham *et al.*, 2002; Xiao, 2009). Infeções no aparelho respiratório por este parasita também já foram descritas na literatura (possivelmente pelo ar) (Painter *et al.*, 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016). Os oocistos apresentam características que contribuem para a sua disseminação e ubiquidade no ambiente e consequentemente a transmissão das várias espécies de *Cryptosporidium*: elevada resistência aos níveis de cloro recomendado pelo CDC (1-3 mg/L) no tratamento de água para consumo público e fins recreativos (Osman *et al.*, 2015); elevada resistência aos fatores ambientais adversos; possuem um tamanho bastante reduzido; são excretados em grande número nas fezes e esporulados (o que facilita a transmissão através do contacto direto entre indivíduos); baixa dose infecciosa e elevado potencial zoonótico (reservatórios animais, os quais são responsáveis pela dispersão dos oocistos no ambiente, contaminação da água e alimentos). O género *Cryptosporidium* tem um ciclo de vida direto e pode se propagar por autoinfeção principalmente em indivíduos imunocomprometidos, onde ocorre a excreção do oocisto já esporulado e consequentemente a libertação de esporozoítos no lúmen intestinal (Fayer *et al.*, 2000; Painter *et al.*, 2015; Shimelis, Tassachew & Lambiyo, 2016). Os protozoários do género *Cryptosporidium* são microrganismos intracelulares obrigatórios (Current & Garcia, 1991; Fayer, 2004; Smith

*et al.*, 2005), com a peculiaridade de serem extracitoplasmáticos. São intracelulares uma vez que penetram na membrana do enterócito, formando um vacúolo parasitóforo, e extracitoplasmáticos porque se localizam fora do citoplasma da célula hospedeira (Tzipori & Griffiths, 1998). Têm o ciclo de vida desenvolvido num só hospedeiro; são, portanto, parasitas monóxenos (O' Donoghue, 1995; Egyed *et al.*, 2003; Carey *et al.*, 2004; Smith & Nichols, 2007), compreendendo uma fase infetante, uma de reprodução assexuada (esquizogonia/merogonia) e outra de reprodução sexuada (gametogonia/espogonia). O ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. está descrito sucintamente na Figura 6.



**Figura 6:** Representação esquemática do ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. Adaptado e modificado de Smith & Rose, 1998.

**Quadro clínico e sintomatologia:** A infecção causada por *Cryptosporidium* spp. inclusive por *C. hominis* e *C. parvum* pode ser assintomática, autolimitada ou crónica (Fernandes *et al.*, 2015). *Cryptosporidium* spp. é um agente causador de diarreia, que se manifesta de diferentes formas consoante o sistema imunitário do hospedeiro (Shimelis, Tassachew & Lambiy, 2016). As diversas manifestações clínicas dependem também das características de virulência das espécies e subtipos envolvidos na criptosporidiose

humana (Cama *et al.*, 2007). Nos indivíduos imunocompetentes a infeção geralmente é assintomática (Leav *et al.*, 2003; Borad & Ward, 2010) ou autolimitada (Chen *et al.*, 2002; Chalmers & Davies, 2010). O sintoma mais comum descrito nestes indivíduos é a diarreia, normalmente aquosa, apresentando-se por vezes com muco, mas sem sangue ou leucócitos (Quihui-Cota *et al.*, 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016; Speich *et al.*, 2016). Na grande maioria dos casos clínicos, a diarreia é acompanhada de vómitos, náuseas, dores abdominais, febre, fadiga, desidratação e perda de peso (Fayer, 2004; Ramirez *et al.*, 2004; Chalmers & Davies, 2010).

Nas crianças, principalmente nos países com baixa e média onde a doença é endémica, a criptosporidiose constitui uma das principais causas de diarreia, por vezes com sangue oculto, leucócitos e lactoferrina (Clark, 1999; Newman *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2004; Borad & Ward, 2010). A diarreia persistente em crianças, conduz a problemas subsequentes no desenvolvimento físico e na função cognitiva (Leav *et al.* 2002; Huang *et al.*, 2004; Borad & Ward, 2010). No que diz respeito aos indivíduos imunocomprometidos, estes são mais suscetíveis à infeção por *Cryptosporidium* spp., nomeadamente indivíduos com VIH/sida (onde as células T CD4<sup>+</sup> são inferiores a 150 cél/mm<sup>3</sup>), doentes sujeitos a quimioterapia e transplantados (Clark, 1999; Hunter & Nichols, 2002; Tzipori & Ward, 2002; Carey *et al.*, 2004; Borad & Ward, 2010). Nestes doentes, a criptosporidiose manifesta-se por diarreia crónica (Fayer, 2004; Xiao & Cama, 2006; Chalmers & Davies, 2010), com perdas de fluido e peso corporal, o que leva a desidratação severa, má absorção e desnutrição, podendo ser letal nalguns casos (Chen *et al.*, 2002; Hunter & Nichols, 2002; Ramirez *et al.*, 2004; Putignani & Menichella, 2010). Na maioria dos casos a infeção ocorre no intestino delgado, contudo em doentes com sida podem ocorrer infeções gástricas, hepatobiliares, pancreáticas e pulmonares (Halliez & Buret, 2015; Painter *et al.*, 2015).

**Diagnóstico e tratamento:** A deteção e identificação dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. em amostras biológicas dos hospedeiros e ambientais tem sido realizada tradicionalmente por microscopia ótica, onde os oocistos podem ser visualizados a fresco ou após concentração, ou ainda após coloração dos esfregaços fecais, nomeadamente pelas técnicas Ziehl-Neelsen modificada e Kinyoun (Casemore, Armstrong & Sands, 1985; Osman *et al.*, 2015; Sunnotel *et al.*, 2006; Xiao & Cama, 2006). O diagnóstico parasitológico é muito útil, principalmente nos países com baixa e média renda, uma vez

que não requer microscópios específicos, tem baixo custo, é de fácil utilização e, permite a detecção simultânea de outros parasitas (Sunnotel *et al.*, 2006; Xiao & Cama, 2006). No entanto apresenta algumas desvantagens, em particular a baixa sensibilidade e especificidade das colorações, assim como a necessidade de um profissional treinado (Leav *et al.*, 2003; Jex *et al.*, 2008a). Para a realização do diagnóstico microscópico, devem ser analisadas pelo menos duas amostras por doente, recolhidas em dias alternados, dado que a excreção de oocistos pode ser intermitente (Painter *et al.*, 2015). As técnicas de ELISA também estão disponíveis para a detecção de antígenos nas amostras fecais e, apresentam maior sensibilidade e especificidade comparativamente à microscopia ótica (Xiao & Cama, 2006; Jex *et al.*, 2008a).

Nos países desenvolvidos os ensaios de imunofluorescência (IFA) têm sido utilizados para a detecção de oocistos (Painter *et al.*, 2015) assim como os métodos moleculares (PCR), uma vez que permitem não somente a identificação das espécies, mas também a detecção de variação genética dentro e entre as espécies nos vários tipos de amostras (Osman *et al.*, 2015; Painter *et al.*, 2015). O gene SSU rRNA das espécies de *Cryptosporidium* tem sido amplamente utilizado na genotipagem de *Cryptosporidium* spp. nos humanos, nos animais e nas amostras de água (Xiao, 2010), uma vez que para além de evoluir lentamente, caracteriza-se sobretudo pela presença de regiões polimórficas, alternadas com regiões bastante conservadas devido a variações na sequência limitadas a várias regiões do gene (Xiao *et al.*, 2004). Também o gene GP60 (localizado no cromossoma VI), que é um gene de cópia única que não apresenta intrões, tem sido utilizado na identificação de subtipos das espécies de *Cryptosporidium* e constitui atualmente o marcador molecular mais polimórfico identificado no genoma de *Cryptosporidium* spp. (Cevallos *et al.*, 2000; Strong *et al.* 2000; Alves *et al.*, 2003; Gatei *et al.*, 2006a; Leoni *et al.*, 2007; Wielinga *et al.*, 2008; Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011; Eibach *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2015). Com base na amplificação de um fragmento do gene GP60 já foram identificadas seis famílias de subtipos de *C. hominis*, às quais é atribuída a designação I (Ia, Ib, Id-Ig) e 11 de *C. parvum*, representado por II (IIa-IIi, IIk e III) (Xiao, 2010; Waldron & Power, 2011; Osman *et al.*, 2015).

Não existe, até o momento, nenhum fármaco específico e eficaz para o tratamento da criptosporidiose. Atualmente a nitazoxanida é o único fármaco aprovado pela FDA dos EUA (*Food and Drug Administration*) em 2005, para o tratamento dos sintomas causados

por *Cryptosporidium* spp. que pode ser administrado em indivíduos com idade igual ou superior a 1 ano (Painter *et al.*, 2015). Por ser bem tolerado pelo organismo do hospedeiro e ter baixa incidência de efeitos secundários, tem sido utilizado em várias partes do mundo, especialmente na América Central e do Sul. No caso dos indivíduos imunocomprometidos não está aprovado para o tratamento de criptosporidiose (Snelling *et al.*, 2007; Das *et al.*, 2013; Yoder & Beach, 2010). Nos indivíduos imunocompetentes, inclusive grávidas o sistema imunitário destes indivíduos consegue debelar a infeção sem a necessidade de recorrer a fármacos (Hunter & Nichols, 2002; Chalmers & Davies, 2010; Das *et al.*, 2013).

### 1.4.1.6. *Blastocystis hominis*

**Epidemiologia:** Durante muitos anos, os investigadores acreditavam que uma única espécie de *Blastocystis* infetava os humanos, enquanto outras espécies infetavam animais. Assim chamaram *Blastocystis hominis* (*B. hominis*) à espécie que infetava os humanos e deram diferentes nomes às outras espécies que infetavam animais, como por exemplo *Blastocystis ratti* dos ratos. No entanto nos últimos anos, várias análises genéticas têm demonstrado que diferentes espécies de *Blastocystis* podem infetar os humanos e qualquer uma destas espécies pode ser identificada como *B. hominis* (Noël *et al.*, 2005; Puthia *et al.*, 2006). Dado a isso, os investigadores propuseram interromper o uso do termo *B. hominis* como uma espécie única que infeta seres humanos e sugeriram *Blastocystis* sp. (Noël *et al.*, 2005; Puthia *et al.*, 2006).

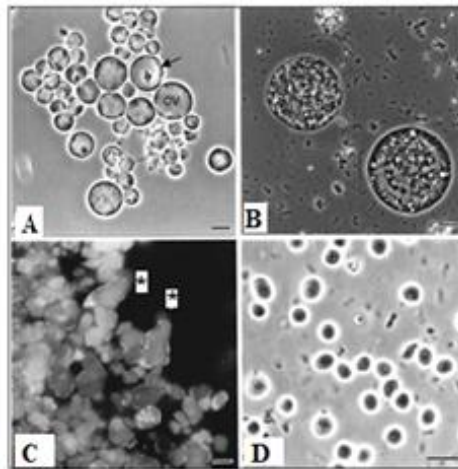
*Blastocystis hominis* foi classificado pelos primeiros investigadores como material vegetal e fungo (Zierdt, 1991; Tan, 2004). Atualmente, é descrito como um protozoário entérico, cosmopolita que infeta o aparelho gastrointestinal de diferentes hospedeiros (humanos, gado, aves, roedores, répteis, anfíbios, peixes e baratas) e é frequentemente descrito como o eucariota unicelular mais comum encontrado em amostras fecais dos seres humanos (Noël *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2016). A sua prevalência pode atingir 20% nos países industrializados, e 100% (prevalência obtida num estudo feito por Safadi e colaboradores em crianças de uma zona rural em Senegal) nos países de baixa e média renda onde as condições de saúde e higiene são precárias. Destacando assim o impacto da blastocistose principalmente em crianças dos países de baixa e média renda (Safadi *et al.*, 2014; Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016). Apesar de a sua descrição ter ocorrido

há mais de 100 anos, existe pouca informação sobre a sua patogénese, opções de tratamento, diversidade genética, variedade e especificidade de hospedeiros (Salvador *et al.*, 2016). Com base na comparação de sequências de genes da pequena subunidade rRNA (SSU rRNA), 17 subtipos (STs, ST1 a ST17) foram descritos, em que nove dos quais (ST1 a ST9) foram encontrados em seres humanos com prevalência variável. Aproximadamente 90% dos isolados pertenciam de ST1 a ST4, com predominância de ST3 (cerca de 60% destes isolados) (Safadi *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2016; Govind & Rajamanikam, 2013). Até à data, ST9 é restrito aos seres humanos e foi identificado em apenas três pessoas da Dinamarca e do Japão (Alfellani *et al.*, 2013).

**Morfologia:** *Blastocystis hominis* é um protozoário polimórfico, que apresenta quatro formas morfológicas principais (vacuolar, granular, amebóide e quisto) (Dhurga, Suresh & Tan, 2016; Safadi *et al.*, 2016). A forma vacuolar é a forma celular típica de *Blastocystis*, observada frequentemente em cultura e em amostras de fezes e é utilizada para a identificação do organismo (Dhurga, Suresh & Tan, 2016). Estas formas são esféricas e apresentam grandes variações de tamanho (2-200  $\mu\text{m}$ ) (Figura 7A). Esta forma é também conhecida como corpo central porque apresenta um grande vacúolo central (aproximadamente 90% do volume da célula), cuja função do vacúolo ainda não é clara, tendo sido sugerido que possa ter funções: de armazenamento, na divisão celular durante a reprodução e na deposição de células apoptóticas (Tan, 2008). A forma granular é morfológicamente semelhante à forma vacuolar, exceto por apresentar grânulos distintos no vacúolo central e/ou no citoplasma (Figura 7B) (Boreham & Stenzel 1993; Singh *et al.*, 1995; Tan, 2008; Dhurga, Suresh & Tan, 2016). A forma amebóide desempenha um papel na patogénese e possui características típicas das formas vacuolares, com exceção de apresentar um ou dois pseudópodes (Figura 7C). Contudo estas formas não são móveis (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008; Tan, 2008).

A forma de quisto varia de ovoide a esférica, tem tamanho mais reduzido (2-5  $\mu\text{m}$ ), dificultando assim a sua identificação nas amostras fecais (Figura 7D) e foi descrita recentemente. É a forma de desenvolvimento transmissível e a mais resistente (parede espessa com multicamadas). O citoplasma do quisto pode conter um a quatro núcleos, mitocôndrias, depósitos de glicogénio e pequenos vacúolos (Zaman, Howe, & Ng. 1995; Tan, 2008; Safadi *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2016).

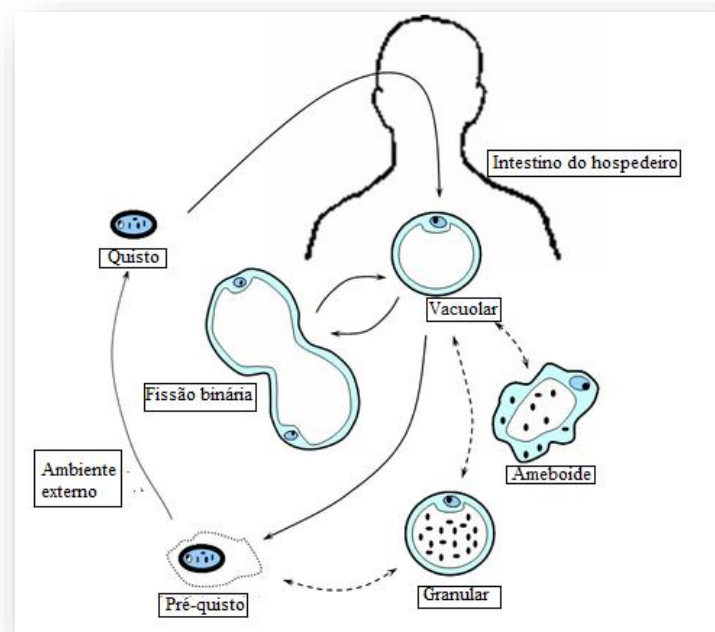
Foram também descritas as formas avacuolar (sem vacúolo central) e multivacuolar (com vários vacúolos pequenos) (Stenzel & Boreham, 1996; Tan, 2008).



**Figura 7:** Formas de desenvolvimento de *B. hominis*. (A) Forma vacuolar com um grande vacúolo central (VC), núcleo e estruturas semelhantes a mitocôndria (seta). (B) Forma granular com numerosos grânulos no interior. (C) A forma ameboide com uma ou mais projeções citoplasmáticas semelhantes a pseudópodes (\*). (D) A forma de quisto. Adaptado de Tan, 2004.

**Transmissão e ciclo de vida:** O quisto de *B. hominis* é transmitido por duas vias: diretamente pela via fecal-oral e/ou indiretamente pelo consumo de água e alimentos contaminados com o parasita (Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016), uma vez que os quistos são capazes de sobreviver por um longo período de tempo em fezes dos hospedeiros e em fontes ambientais. Por outro lado, são resilientes à cloração convencional utilizado na desinfecção da água, facilitando assim a transmissão do parasita (Tan, 2004; Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016). Dados filogenéticos sugerem que *Blastocystis* é um protozoário zoonótico, e acredita-se que a transmissão de infecções dos animais (galinhas, ratos e porcos constituem reservatórios) para os seres humanos é muito comum (Puthia *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2016). O ciclo de vida de *B. hominis* está descrito na Figura 8.





**Figura 8:** Representação esquemática do ciclo de vida de *B. hominis*. Adaptado de Tan, 2004.

**Quadro clínico e sintomatologia:** A patogenicidade deste protozoário é controverso e não está ainda totalmente estabelecida (Lader *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2016; Speich *et al.*, 2016). Contudo, *B. hominis* é frequentemente encontrado em indivíduos assintomáticos embora tenha sido associado a uma variedade de sintomas gastrointestinais não específicos, incluindo diarreia, dor abdominal, anorexia, náuseas, vômitos, urticárias e síndrome do intestino irritável. Vários estudos sugerem que os indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis a infecções causadas por *B. hominis* (Brites *et al.*, 1997; Ok *et al.*, 1997; Puthia *et al.*, 2006). Por outro lado, diferenças na suscetibilidade da flora intestinal do hospedeiro e/ou potencial patogénico dos subtipos genéticos de *B. hominis* foram sugeridas como possíveis explicações para essa variedade de manifestações clínicas descritas (Roberts *et al.*, 2014; Scanlan *et al.*, 2014; Forsell *et al.*, 2016). No entanto é difícil de se estabelecer uma relação entre a infecção e os sintomas diante da possibilidade de coinfeção com outros agentes etiológicos que infetam o aparelho gastrointestinal (Azizian *et al.*, 2016; Forsell *et al.*, 2016; Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2016).

**Diagnóstico e tratamento:** O diagnóstico de blastocistose constitui ainda um desafio para os investigadores, uma vez que a sua patogénese é controversa. Por outro lado, as

formas vacuolares frequentemente observadas podem não estar presentes em amostras fecais, e os quistos de tamanho reduzido, quando presente, podem ser difíceis de identificar (Tan, 2008). No entanto a blastocistose é geralmente diagnosticada tradicionalmente por microscopia ótica, onde os quistos podem ser visualizados a fresco ou após concentração e coloração (nomeadamente tricrómio e solução de Lugol) (Tan, 2008; Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016). Também a análise serológica baseada em técnicas de ELISA ou IFA são frequentemente utilizadas no diagnóstico da blastocistose (Tan, 2008; Ibarra *et al.*, 2016; Safadi *et al.*, 2016). Porém, devido à diversidade genética de *B. hominis* não é aconselhável incluir a serologia no diagnóstico laboratorial de rotina, devendo limitar-se a estudos epidemiológicos e serológicos (Tan, 2008).

Atualmente, pode-se efetuar, quando possível, o diagnóstico de blastocistose usando métodos moleculares em particular a PCR convencional e RT-PCR em associação com outras técnicas, como polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR. Sendo que o gene SSU rRNA constitui atualmente o marcador molecular amplamente utilizado na identificação de subtipos de *B. hominis* (Meloni *et al.*, 2011; Safadi *et al.*, 2016). Os métodos moleculares apresentam maior sensibilidade e especificidade comparativamente às técnicas mencionadas anteriormente.

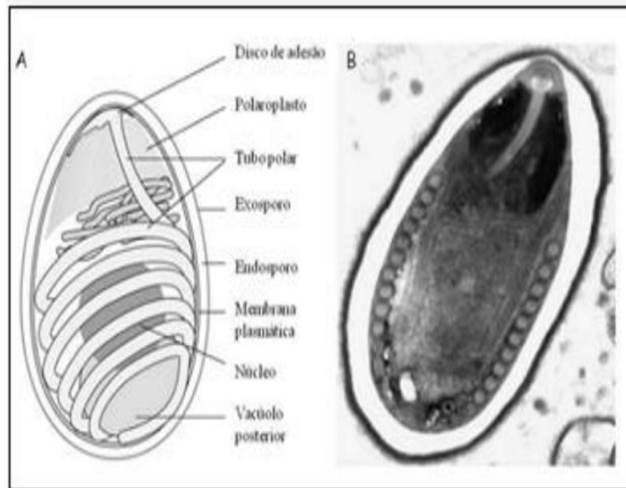
A necessidade de tratar os indivíduos infetados por *B. hominis* é equívoca, dado que a sua patogénese não está estabelecida e os sintomas são autolimitados e inespecíficos (Babb & Wagener, 1989; Tan, 2008). Nos casos em que o tratamento é justificado, o metronidazol é o antibiótico de eleição, frequentemente prescrito (Moghaddam, Ghadirian, & Azami 2005; Tan, 2008) em combinação com outros fármacos tais como paramomicina (Pasqui *et al.*, 2004) ou trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) (Tan, 2008; Sekar & Shanthi, 2013). Também fármacos antimicrobianos como nitazoxanida, iodoquinol, tinidazol, cetoconazol, secnidazol, e emetina têm sido utilizados para o tratamento desta infeção (Sekar & Shanthi, 2013). Contudo, devido à extensa heterogeneidade genética de *B. hominis* pode ocorrer insucesso no tratamento (Tan, 2008).

#### 1.4.1.7. Microsporídeos

**Epidemiologia:** Os microsporídeos compreendem um grupo de microrganismos eucariotas, intracelulares obrigatórios pertencentes ao filo Microsporidia que têm suscitado o interesse dos parasitologistas há mais de 100 anos (Bednarska *et al.*, 2014). A primeira espécie, *Nosema bombycis* (*N. bombycis*), foi descoberta em meados do século XIX como a causa da doença do bicho-da-seda (também designado por doença da pimenta ou doença de pebrina), que quase destruiu a indústria do bicho-da-seda (sericultura) no sul da Europa (Franzen, 2008; Bednarska *et al.*, 2014). Mais de 1400 espécies de microsporídeos foram descritos em hospedeiros invertebrados e vertebrados, e destas apenas sete géneros e 15 espécies de microsporídeos têm sido associados a infeções humanas (Bednarska *et al.*, 2014). O primeiro caso da infeção no homem foi registado em 1959 num rapaz japonês de 9 anos de idade que apresentava microsporidiose disseminada associada a febre, cefaleia, vômitos e convulsões espáticas (Matsubayashi *et al.*, 1959; Bednarska *et al.*, 2014). O interesse por este grupo de parasitas começou em 1980 com a pandemia do VIH em todo o mundo. Em 1985, uma nova espécie de microsporídeo (*Enterocytozoon bieneusi*) foi encontrada num doente com diarreia persistente, infetado pelo VIH. Desde então, diversas espécies de microsporídeos têm sido identificadas como agentes etiológicos de infeções oportunistas (Desportes *et al.*, 1985; Bednarska *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). As espécies de microsporídeos mais frequentes como causa de microsporidiose em seres humanos são: *Enterocytozoon bieneusi* (*E. bieneusi*), *Encephalitozoon intestinalis* (*E. intestinalis*), *Encephalitozoon hellem* (*E. hellem*), *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*), *Encephalitozoon* spp., *Trachipleistophora antropophthera* (*T. antropophthera*), *Trachipleistophora hominis* (*T. hominis*), *Pleistophora* spp., *Vittaforma corneae* (*V. corneae*), *Nosema ocularum* (*N. ocularum*), *Nosema connori* (*N. connori*), *Brachiola vesicularum* (*B. vesicularum*), *Brachiola algerae* (*B. algerae*), *Microsporidium africanum* (*M. africanum*), *Microsporidium ceylonensis* (*M. ceylonensis*) (Franzen & Müller, 2001). As espécies *E. bieneusi* e *E. intestinalis* são os responsáveis por causar microsporidiose intestinal, sendo *E. bieneusi* o mais comum, e o responsável por 90% das infeções causadas por microsporídeos (Ghoshal *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

A microsporidiose humana ocorre em todo o mundo, mas os dados sobre a prevalência e a distribuição geográfica destas infeções ainda são incompletos e muito diversificados

devido ao uso de diferentes métodos de diagnósticos e subgrupos de hospedeiros. Embora muitos trabalhos demonstrem infecção microsporidial em doentes com VIH, os estudos epidemiológicos efetuados em outros grupos de risco são ainda escassos (Bednarska *et al.*, 2014).



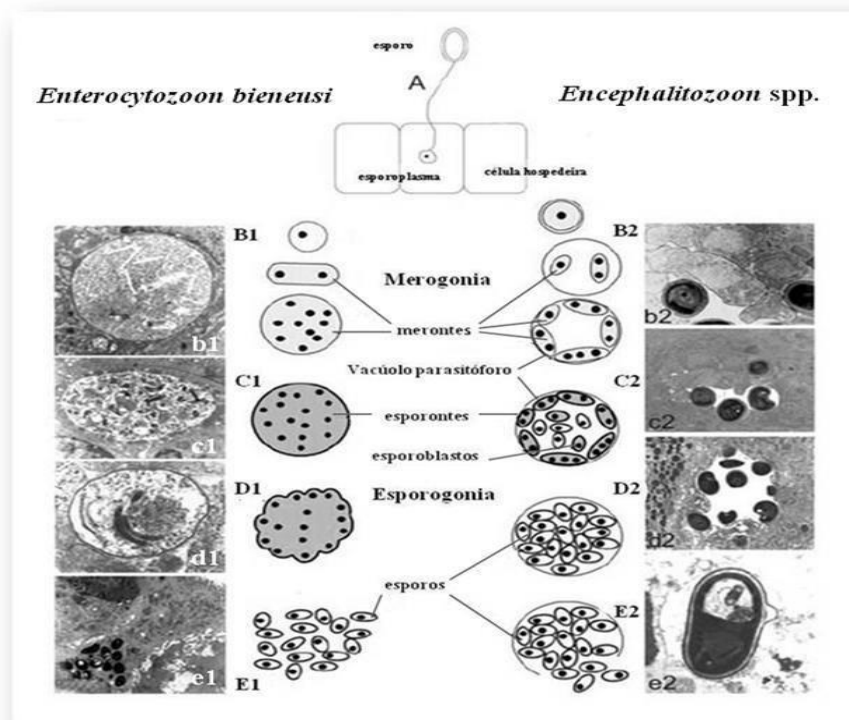
**Figura 9:** (A) Diagrama e (B) fotografia de microscopia eletrônica de transmissão da estrutura interna de um esporo de microsporídeo. Adaptado de Franzen 2008.

**Morfologia:** Os esporos são o único estágio, do ciclo de vida, que sobrevive no exterior do seu hospedeiro, e a sua forma é mais ou menos constante entre as espécies do mesmo género. (Didier, 1998; Bigliardi & Sacchi, 2001). Os esporos maduros (Figura 9), de microsporídeos infetantes dos mamíferos, apresentam em geral uma forma oval e piriforme e reduzidas dimensões, medindo entre

1,0-3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5-5,0  $\mu\text{m}$  de largura (Didier 1998; Cali & Takvorian 1999). O esporo maduro de *E. bieneusi*, é o mais pequeno de todos os esporos de microsporídeos (1,1-1,6 por 0,7-1,0  $\mu\text{m}$ ) (Franzen & Muller, 2001). Os estágios proliferativos podem ser arredondados e ligeiramente maiores. A parede do esporo consiste numa camada interna (endósporo), coberta por uma segunda camada mais densa aos eletrões, composta por microfibrilas (exósporo). A parede do esporo é rica em quitina e as suas propriedades mecânicas conferem aos microsporídeos um elevado grau de resistência em condições ambientais adversas, e permitem ainda o aumento da pressão hidrostática, que causa a extrusão do esporoblasto (Bigliardi & Sacchi, 2001). O filamento polar é constituído por um tubo espiral ancorado no disco de adesão junto do pólo anterior do esporo, formando uma espiral com várias voltas até à região posterior do esporo. Esta estrutura é exclusiva dos microsporidia, não tendo sido descrita até á data, em qualquer outro grupo de organismos. Na extremidade posterior do filamento polar encontra-se o núcleo, em que o número varia de género para género e o vacúolo posterior com função desconhecida (Cali & Takvorian, 1999). A envolver o núcleo e o aparelho de

extrusão encontra-se, uma membrana plasmática que confere proteção ao esporo (Cali & Takvorian, 1999).

**Transmissão e ciclo de vida:** A infecção no Homem por microsporídeos, inclusive por *E. bienewi*, ocorre principalmente através da via fecal-oral e/ou urinária-oral pelo contacto direto de pessoa a pessoa, de pessoas com animais, pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados com esporos do parasita, sugerindo-se ainda que a transmissão possa ocorrer por via aérea, através de inalação dos esporos (Didier *et al.*, 1998; Slifko *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2015; Stentiford *et al.*, 2016). Infecções oculares podem ser transmitidas por contato com mãos contaminadas com o parasita e a transmissão transplacentária, descrita em outros animais, não foi comprovada na espécie humana (Didier *et al.*, 1998). O ciclo de vida dos microsporídeos, está representado na Figura 10.



**Figura 10:** Representação esquemática do ciclo de vida de dois gêneros de microsporídeos patogênicos para o Homem, um que se desenvolve em contacto directo com o citoplasma da célula hospedeira (*E. bienewi*) e o outro que ocorre dentro de um vacúolo parasitóforo (*Encephalitozoon* spp.). (A) Esporo vazio após injectar através do tubo polar o esporoplasma no citoplasma da célula hospedeira. (B1 a D1) Desenvolvimento intracelular de *E. bienewi* em contacto directo com citoplasma da célula hospedeira. (E1) Esporos maduros; (B2 a D2) Desenvolvimento do ciclo de *Encephalitozoon* spp dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma da célula hospedeira. (E2) Libertação dos esporos maduros no citoplasma da célula hospedeira após ruptura da membrana do vacúolo; (a1 a e1 e b2 a e2) Fotografias de microscopia eletrônica de transmissão de diferentes estádios do ciclo de vida de *E. bienewi* e *Encephalitozoon* spp., respectivamente. Adaptado de Franzen 2008.

**Quadro clínico e sintomatologia:** As manifestações clínicas da microsporidiose dependem do estado imunológico do doente e do local da infeção. Os grupos de risco envolvem pessoas com VIH, doentes submetidos a terapêutica imunossupressora, após transplante de órgãos, viajantes para zonas endémicas, crianças e idosos (Bednarska *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2015; Stentiford *et al.*, 2016). A infeção humana por *E. bienersi*, exprime-se clinicamente como uma síndrome de má-absorção (Bednarska *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016). Embora a infeção por *E. bienersi* esteja tipicamente associada a diarreia auto-limitada em indivíduos imunocompetentes, os indivíduos imunocomprometidos, como é o caso de doentes com sida com  $\leq 150$  células T CD4<sup>+</sup> por microlitro de sangue, pode causar diarreia crónica, intermitente, e em geral sem muco nem sangue, dor abdominal e perda de peso. Embora o habitat preferencial de *E. bienersi* ser o intestino delgado, pode também ser encontrado em praticamente todos os órgãos, resultando em infeções extra-intestinais: como sinusite, pneumonia, infeções ao nível das vias biliares e vesícula de doentes com colangiopatia (Didier, 2005; Franzen, 2008; Bednarska *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016).

**Diagnóstico e tratamento:** As pequenas dimensões dos esporos de microsporídeos dificultam o diagnóstico (Ashikin *et al.*, 2016). Os esporos podem ser detetados em diversos fluídos corporais e em amostras de fezes.

Quando os esporos são abundantes nas amostras biológicas, o exame direto com colorações específicas pode ser adequado para o diagnóstico. No entanto, quando há escassez de formas parasitárias, é importante fazer a sua concentração nas fezes ou na urina (Sodré *et al.*, 1995). O diagnóstico definitivo da microsporidiose fundamenta-se na observação dos microsporídeos em biópsias de tecidos, nos fluídos corporais ou, ainda, em amostras de fezes, observadas por microscopia eletrónica de transmissão (MET) (Weber *et al.*, 1999b). Para a deteção de microsporídeos na urina, fezes ou muco podem ser usadas técnicas de coloração, como o tricrómio modificado de Weber e as substâncias quimiluminescentes (Calcoflúor, fungiflúor e Uvitex 2B) (Weber *et al.*, 1992a; Contreas *et al.*, 1996; Didier, 1998; Franzen & Muller 1999b; Goodgame *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 1999b). Estes fluorocromos possuem elevada afinidade para a camada quitinosa (endosporo) do esporo. Outro método de coloração que tem sido bem-sucedido em diferentes tipos de amostras é a coloração Gram-Chromotrope (Moura *et al.*, 1997).

A técnica de imunofluorescência indireta (IFI), associada a anticorpos poli e monoclonais anti-microsporídeos marcados com fluorocromos, bem como a PCR têm sido utilizados no diagnóstico e diferenciação de espécies destes parasitas (Didier *et al.*, 1995; Kotler & Orenstein, 1998; Ashikin *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). No entanto, a identificação de espécies de microsporídeos e caracterização genética depende quase exclusivamente de métodos moleculares (Mansfield *et al.*, 1997; Matos, Lobo & Xiao, 2012). Genes como SSU rRNA e ITS rRNA, constituem marcadores moleculares utilizados em estudos de identificação de diversidade genética de microsporídeos (Didier *et al.*, 1995b; Mathis *et al.*, 1999b; Haro *et al.*, 2003; Mathis *et al.*, 2005; Matos, Lobo & Xiao, 2012; Ashikin *et al.*, 2016). Os testes serológicos não são úteis no diagnóstico, no entanto, podem ser utilizados para estudos epidemiológicos (Bednarska *et al.*, 2014).

Não existe fármaco eficaz para o tratamento da microsporidiose, uma vez que a dificuldade de penetração destes, na espessa parede do esporo do parasita, constitui um obstáculo para o tratamento da microsporidiose, no entanto tratamentos com fumagilina e albendazol parecem promissores (Didier, 2005; Franzen, 2008). O tratamento dos doentes com sida usando antirretrovirais, resulta num aumento dos níveis dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e consequentemente na redução da carga viral, conduzindo assim a um declínio na prevalência da maioria das infeções oportunistas, incluindo a microsporidiose (Didier, 2005; Franzen, 2008; Matos, Lobo & Xiao, 2012). Alguns fármacos parecem ser mais eficientes nalgumas espécies e noutras não existe nenhuma terapêutica eficaz. *E. intestinalis* é sensível à terapêutica com albendazol, ao contrário de *E. bienersi*, constituindo a distinção das espécies uma importante informação para o clínico (Chu & West 1996; Didier & Weiss 2006; Boileau *et al.*, 2016).

### 1.4.2. Helminths

Os helmintas incluem espécies de vida livre e parasitas pertencentes, principalmente, aos Filos Platyhelminthes (achatados em forma de folha ou fita) e Nematelminthes (cilíndricos). Podem infetar o aparelho gastrointestinal, urinário e o sangue do hospedeiro (Brooker & Bundy 2009).

Os nematodes ou vermes redondos, são organismos cilíndricos, não segmentados, bilateralmente simétricos, que têm aparelho digestivo completo e reprodução sexuada. A

maioria destes vermes redondos tem ciclos de vida complexos, que envolvem várias formas larvares, hospedeiros intermediários ou estádios de vida livre. De entre os helmintas, destacam-se principalmente os geohelmintas, que são o grupo de parasitas mais prevalentes nos humanos, infectando mais de 2 mil milhões de pessoas em todo o mundo (Harhay *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2016; Gogoi & Yadav, 2016; Kiani *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016). Infetam os seres humanos quando as larvas penetrem na pele (*Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*) ou pela via fecal-oral (*Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*) (Alemu *et al.*, 2016; Leung *et al.*, 2016; O'Connell & Nutman, 2016). Os nematodes intestinais e os Schistosomas, são considerados os helmintas que causam maior morbilidade humana (Brooker *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos cestodes, compreendem um grupo de parasitas hermafroditas com sistema nervoso e sem aparelho digestivo. Na fase adulta são achatados, em forma de fita, com o corpo dividido em segmentos (proglotes). O ciclo de vida destes parasitas é determinado pelos hospedeiros intermediários, que abrigam as formas larvares, e pelo hospedeiro definitivo, no qual vivem as formas adultas, sendo o Homem o hospedeiro definitivo das seguintes espécies: *Diphyllobothrium latum*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis nana* e *Dipylidium caninum* (Grácio, 1988; WHO, 2005).

A maioria das infeções causadas por geohelmintas é assintomática, principalmente quando a carga parasitária é baixa (Leung *et al.*, 2016). No entanto quando a carga parasitária é elevada geralmente causam sintomatologia intestinal e outras complicações mais graves (Matthys *et al.*, 2011; Gogoi & Yadav, 2016). Quando identificados, os indivíduos infetados com elevadas cargas parasitárias de geohelmintas devem ser sempre desparasitados, porque apresentam um maior risco de morbilidade e são uma fonte de contaminação ambiental (Leung *et al.*, 2016).

Por outro lado, as infeções por helmintas são frequentemente sub-diagnosticadas devido à carência de profissionais com competência na identificação de ovos e /ou larvas através de métodos tradicionais de microscopia (O'Connell & Nutman, 2016).

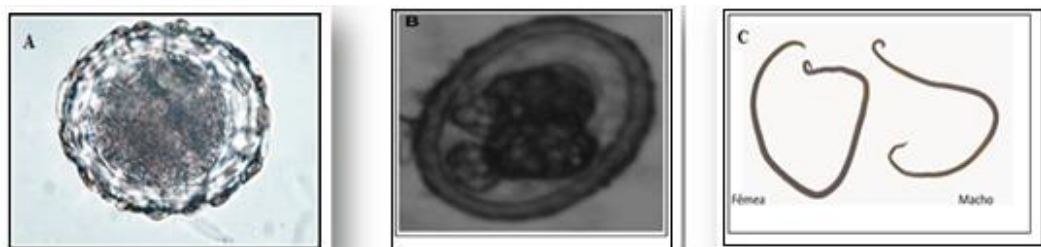
Dadas as prevalências encontradas no presente estudo, faremos a descrição detalhada dos seguintes helmintas intestinais: *Ascaris lumbricoides* e *Hymenolepis nana*.



#### 1.4.2.1. *Ascaris lumbricoides*

**Epidemiologia:** *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) (descrito por Linnaeus em 1758) popularmente conhecido como lombriga é a helmintíase humana mais prevalente no mundo, sendo responsável por causar ascaridíase. Parasita o aparelho gastrointestinal dos seres humanos e estima-se que infete 25% da população mundial (Carneiro, 2002; Dent & Kazura, 2011; Diouf *et al.*, 2016; Khuroo *et al.*, 2016; Ross *et al.*, 2016). É cosmopolita, ocorrendo quer em ambientes tropicais e subtropicais, quer em ambientes temperados, no entanto é mais prevalente em ambientes tropicais onde as condições ambientais são favoráveis para a maturação dos ovos no solo. Afeta principalmente crianças dos países com baixa e média renda onde as condições socioeconômicas, de saúde e higiene são precárias (Harhay, Horton & Oliaro, 2010; Diouf *et al.*, 2016).

**Morfologia:** *Ascaris lumbricoides* é um nematode relativamente grande, que vive no lúmen do intestino delgado (Brooker & Bundy, 2006). O verme adulto é um organismo longo, cilíndrico, com dimorfismo sexual. As dimensões do *A. lumbricoides* masculinos e femininos são cerca de 15-30 cm e 20-40 cm, respetivamente (Figura 11). Possuem forte atividade motora através de uma única camada de músculo longitudinal e contêm todas as vísceras incluindo canal alimentar (boca, faringe, esôfago, intestino médio e reto), sistema excretor, sistema nervoso e o sistema reprodutivo. Os órgãos genitais encontram-se bem desenvolvidos em ambos os sexos (Khuroo *et al.*, 2016). A fêmea liberta cerca de 240.000 ovos por dia e podem ser fertilizados ou não fertilizados. O ovo fertilizado é ovoide, dourado e apresenta evidência de embrionação e o ovo não fertilizado é alongado, com superfície externa irregular e apresenta no seu interior grânulos retráteis mal diferenciados (Figura 11) (Khuroo *et al.*, 2016).



**Figura 11:** Representação esquemática dos ovos e dos vermes adultos de *A. lumbricoides*: **A)** Ovo fértil: adaptado de Bethony *et al.*, 2006, **B)** ovo infértil: adaptado de Souza *et al.*, 2011 e **C)** vermes adultos (fêmea e macho): Adaptado de Bethony *et al.*, 2006.

**Transmissão e ciclo de vida:** O clima é um determinante indispensável para a transmissão ao hospedeiro. Humidade e temperatura adequadas são essenciais para o desenvolvimento larvar no solo. Também fatores como a pobreza, saneamento precário (Bethony *et al.*, 2006; Brooker, Clements & Bundy, 2006), a falta de cuidados de saúde e o baixo nível de educação facilitam a transmissão deste parasita (Silva *et al.*, 2003; Shalaby & Shalaby 2016). Por outro lado, o processo de transmissão é favorecido pelo grande número de ovos produzidos pelas fêmeas e pela resistência dos mesmos ao ambiente exterior. A transmissão ao hospedeiro ocorre por via fecal-oral através do contacto com ovos do parasita, que se encontram em fezes humanas e são dispersas no ambiente pela chuva, vento e insetos (Brooker, Clements & Bundy 2006; Nyarango *et al.*, 2008). Os ovos são ingeridos pelo hospedeiro, quando os alimentos e água estão contaminados e não são cuidadosamente tratados, e quando as crianças brincam em solos contaminados e levam acidentalmente as mãos à boca. No entanto, não ocorre transmissão direta de pessoa a pessoa, ou infeção através de fezes frescas, uma vez que estes vermes não se multiplicam no hospedeiro humano (a re-infeção ocorre apenas como resultado do contacto com estádios infeciosos no ambiente) e são necessárias cerca de três semanas para que os ovos se tornem infeciosos (Dent & Kazura 2011).

*Ascaris lumbricoides* é um geohelminta que requer o solo húmido para embrionação dos ovos. A longevidade dos vermes adultos é estimada em um a dois anos (Brooker & Bundy, 2009). O ciclo de vida deste parasita abrange quatro fases: embrionação, ingestão, migração e maturação das larvas (Khuroo *et al.*, 2016).

**Quadro clínico e sintomatologia:** A maioria das infeções causadas por *A. lumbricoides* são assintomáticas ou com sintomas gastrointestinais inespecíficos (dor abdominal, náuseas, vômitos e diarreia) (Fernandes *et al.*, 2011; Khuroo *et al.*, 2016). Nos hospedeiros infetados com alta carga parasitária ocorre elevada morbidade (Xavier, Domingues & Marcos, 2012), e em alguns casos pode mesmo ocorrer desnutrição, atrasos cognitivos e obstrução intestinal. Estas patologias mais graves surgem principalmente em crianças com idade compreendida entre os três e os sete anos em zonas endémicas (Khuroo *et al.*, 2016). *Ascaris lumbricoides* pode ainda causar outras complicações tais como pancreatite, colecistite ou abscesso hepático devido à migração aberrante da larva (Fernandes *et al.*, 2011; Diouf *et al.*, 2016) e tem sido também associado a um quadro

pneumónico com eosinofilia (Khanna *et al.*, 2015), febre, dispnéia e tosse, também conhecido como síndrome de Loeffler e é causada pela passagem do parasita pelos pulmões. A ascaridíase é também caracterizada por hiperplasia de mastócitos e altos níveis de imunoglobina E (IgE) circulante (Shalaby & Shalaby 2016).

**Diagnóstico e tratamento:** Os quadros clínicos não permitem distinguir a ascaridíase de outras helmintíases intestinais havendo, portanto, necessidade de confirmação pela identificação de ovos e formas adultas, nos exames parasitológicos de fezes e também na expetoração do hospedeiro. O método de referência usado para o diagnóstico da ascaridíase consiste na identificação de ovos do parasita em amostras fecais do hospedeiro através da sua observação ao microscópio ótico. Como os ovos podem ser difíceis de detetar em infeções com baixa carga parasitária, recomenda-se um procedimento de concentração das fezes do hospedeiro (Brooker & Bundy, 2009).

Os derivados de benzimidazóis (Mebendazol, Albendazol) são o grupo de fármacos mais amplamente utilizados no tratamento da ascaridíase, devido à sua elevada eficácia e facilidade de administração (Fernandes *et al.*, 2011) enquanto o citrato de piperazina é o fármaco de eleição nos casos em que ocorre obstrução intestinal nos indivíduos infetados (Araújo & Guimarães, 2000).

### 1.4.2.2. *Hymenolepis nana*

**Epidemiologia:** *Hymenolepis nana* (*H. nana*) é o cestode mais prevalente no mundo, apresentando uma prevalência global que oscila entre os 0,1 a 58%, infetando maioritariamente crianças (Harhay, Horton & Olliaro, 2010; Almeida *et al.*, 2013). A infeção intestinal causada por *H. nana* tem distribuição cosmopolita e é mais frequente em países tropicais e subtropicais com condições sanitárias precárias (Mehraj *et al.*, 2008; Cabeza *et al.*, 2015; Tompson, 2015).

**Morfologia:** Os ovos de *H. nana* (30-50 µm de diâmetro), são transparentes e possuem uma oncosfera com seis ganchos envolvidos por duas membranas, uma externa e outra interna que contém vários filamentos (Figura 12A). O verme adulto (2-4 cm de comprimento e apenas 1 mm de largura) é constituído por escólex com quatro ventosas (responsável pela fixação ao intestino dos hospedeiros), rostelo e proglótes muito estreitos

que possuem órgãos genitais masculinos e femininos (Figura 12B) (Huggins, Medeiros & Oliveira, 1993; Neves *et al.*, 2004; Cabeza *et al.*, 2015; Tompson, 2015).



**Figura 12:** Representação esquemática dos ovos e do verme adulto de *H. nana*: **A)** Ovos; adaptado de (Sullivan, 2000) e **B)** Verme Adulto; adaptado de Tompson, 2015.

**Transmissão e ciclo de vida:** A transmissão é fecal-oral ou por autoinfecção interna ou externa (Cabeza *et al.*, 2015; Tompson, 2015). Evidências epidemiológicas sugerem que a transmissão direta, sem a necessidade de um hospedeiro intermediário é a via mais comum de infecção humana com *H. nana*, particularmente em ambientes onde a frequência de transmissão é provavelmente alta devido à falta de higiene e saneamento inadequado (Baily, 2009). No entanto, ainda é considerada uma zoonose porque os roedores infetados e os hospedeiros intermediários como os artrópodes representam um reservatório de infecção (Cabeza *et al.*, 2015; Tompson, 2015). O risco de transmissão zoonótica pode ser maior em ambientes urbanos pobres e de elevada densidade populacional (Tompson, 2015).

O ciclo de vida de *H. nana* pode ser direto ou indireto. Os ovos são imediatamente infecciosos quando são libertados nas fezes do hospedeiro e não sobrevivem mais do que dez dias no meio exterior. No ciclo direto os ovos infetantes de *H. nana* são excretados nas fezes e posteriormente ingeridos pelo homem através de alimentos ou água contaminada, ou através de mão contaminada pelas fezes (Tompson, 2015). No intestino delgado, ocorre a eclosão das oncosferas que penetram nas vilosidades da mucosa intestinal onde se desenvolvem em larvas cisticercóides. Após a ruptura na vilosidade, as larvas cisticercóides retornam ao lúmen e fixam-se na mucosa intestinal pelo escólex e se desenvolvem em verme adulto produzindo proglótes grávidos que se desintegram no intestino libertando os ovos que pode causar autoinfecção interna com o desenvolvimento de novas larvas cisticercóides e parasitas adultos (Almeida *et al.*, 2013; Tompson, 2015). No ciclo indireto a infecção humana ocorre pela ingestão de insetos (pulgas e gorgulhos) que possuem larvas cisticercóides no tubo digestivo. Ao atingirem o intestino do

hospedeiro fixam na mucosa transformando-se em verme adulto (Neves *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2013).

**Quadro clínico e sintomatologia:** A patogenicidade de *H. nana* depende da idade e da condição geral do indivíduo e da carga parasitária. A infecção é assintomática quando a carga parasitária é baixa, entretanto o aumento dos vermes resulta em manifestações clínicas como dor abdominal, diarreia de intensidade variável, irritabilidade, anorexia e perda de peso principalmente em crianças dos países em desenvolvimento (Cabeza *et al.*, 2015). O parasita pode também provocar ulcerações devido a alterações na mucosa intestinal provocada por infiltração linfocitária no local da infecção (Almeida *et al.*, 2013). Estudos revelam que *H. nana* coexiste com outros parasitas, particularmente em situações onde a frequência da transmissão fecal-oral é elevada. *Giardia duodenalis*, *Entamoeba coli*, *Blastocystis hominis*, bem como espécies de geohelminthas, são os parasitas mais comuns nas infecções poli parasitárias (Tompson, 2015).

**Diagnóstico e tratamento:** O diagnóstico realiza-se através da identificação microscópica de ovos nas fezes após concentração (Cabeza *et al.*, 2015).

O praziquantel, albendazol, niclosamida e nitazoxanida são os fármacos de eleição para o tratamento da heminolepíase (Kappagoda *et al.*, 2011; Cabeza *et al.*, 2015), no entanto podem não ser eficazes para controlar o parasita em focos endêmicos, onde a frequência de transmissão é elevada. Em tais circunstâncias, pode ocorrer re-infecção e a prevenção da re-infecção requer educação, adoção de boas práticas de higiene pelas populações e implementação de infraestruturas de saneamento (Tompson 2015).

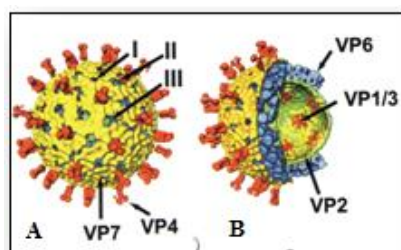
### 1.4.3. Outros agentes etiológicos que causam diarreia

#### 1.4.3.1. Rotavírus

**Epidemiologia:** Rotavírus (RV) é um vírus sem invólucro, pertencente ao género Rotavírus e membro da família *Reoviridae* (Esteves *et al.*, 2016). Os RV humanos foram descobertos em 1973 por Ruth Bishop que identificou partículas virais, por microscopia eletrónica (ME), em amostras da mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda (Bishop *et al.*, 1973). Após esta descoberta, vários investigadores de diferentes países começaram a reportar a presença de RV em fezes de crianças com diarreia severa, sendo

considerado como o principal agente etiológico de gastroenterite aguda (GEA) e de diarreia aguda em crianças, por todo o mundo (Bishop *et al.*, 1973; Flewett *et al.*, 1973; Kapikian, 1974; Lanata *et al.*, 2013). Os RV são classificados de acordo com a reatividade sorológica e a variabilidade genética da proteína VP6 em pelo menos oito grupos diferentes (RVA-RVH) e dentro destes múltiplos genótipos (Matthijnssens *et al.*, 2012; Esteves *et al.*, 2016). A prevalência de alguns genótipos varia geograficamente e temporalmente entre países e mesmo dentro de um país (Bánjai *et al.*, 2012; Parashar *et al.*, 2013). O RVA é o grupo mais frequente e responsável por mais de 90% das infecções em seres humanos, afetando países industrializados e países com baixa e média renda, embora com maior prevalência nos países com baixa e média renda da Ásia e da África subsaariana, onde ocorrem mais de 80% das mortes associadas ao RV (Esteves *et al.*, 2016). Nesses países estimam-se que RV seja responsável por aproximadamente 40% de todos os internamentos hospitalares devido a diarreia aguda em crianças com menos de 5 anos de idade (Esteves *et al.*, 2016; Paulo *et al.*, 2016).

**Morfologia:** O genoma dos RV consiste em 11 segmentos de dupla cadeia de ácido ribonucleico (dsRNA) envolvido por uma cápside proteica icosaédrica de três camadas proteicas concêntricas (Figura 13A). As camadas internas e intermédia consistem em proteínas virais VP2 e VP6, respetivamente, enquanto a camada externa é composta por duas proteínas: a VP7 que define os genótipos G e a VP4 sensível à protease que define os genótipos P (Figura 13B). Os RVA codificam seis proteínas estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1-6) (Hariharan, *et al.*, 2004; Pesavento *et al.*, 2006; Greenberg, Harry & Esteves, 2009; Esteves *et al.*, 2016).



**Figura 13 (A e B):** Representação esquemática do corte de uma partícula de rotavírus evidenciando a localização dos diferentes componentes virais. Adaptado de Pesavento *et al.*, 2006.

**Transmissão e ciclo replicativo:** A transmissão ocorre pela via fecal-oral (através das mãos, superfícies, objetos contaminados) e possivelmente pela via respiratória. Durante a infecção por RV, os vírus são excretados nas fezes, durante vários dias, em concentrações

muito elevadas. O vírus permanece infeccioso no meio ambiente entre 9 e 19 dias. Nos países com baixa renda, também pode ser transmitido através de água contaminada uma vez que o vírus resiste aos procedimentos normais de desinfecção da água (Dennehy, 2000).

Os RV replicam-se no aparelho gastrointestinal e infetam os enterócitos das vilosidades do intestino delgado, provocando mudanças estruturais e funcionais no epitélio (Greenberg & Estes 2009). A tripla camada proteica torna-se resistente ao pH ácido do estômago e às enzimas digestivas do aparelho gastrointestinal, facilitando deste modo a infecção. Aparentemente o vírus entra nas células por endocitose por meio de recetores e forma uma vesícula chamada endossoma (Baker & Prasad 2010) e saem na superfície apical, por exocitose ou por lise, através de uma via secretória (Ruiz *et al.*, 2009; Liya *et al.*, 2012; Trask, McDonald & Patton 2012). Os vírus libertados são expostos a proteases do tipo tripsina presentes no trato gastrointestinal, resultando no processamento proteolítico de VP4 para produzir viriões infecciosos (Trask, McDonald & Patton 2012).

**Quadro clínico e sintomatologia:** A infecção pode ser sintomática ou assintomática, dependendo dos fatores virais e da suscetibilidade do hospedeiro. Os sintomas clínicos são influenciados pela idade, afetando com maior gravidade as crianças com idade inferior a 2 anos. No entanto, em recém-nascidos as infecções por RV são assintomáticas, possivelmente devido à presença de anticorpos maternos contra rotavírus. A diarreia é a segunda principal causa de mortalidade infantil no mundo após a pneumonia (Cui *et al.*, 2016). Rotavírus é o principal agente causador de diarreia grave, com perda excessiva de fluidos e eletrólitos, que podem conduzir à morte e é a causa predominante de GEA em crianças de todo o mundo. A desidratação é o quadro clínico mais comum em infecções causadas por RV (Paulo *et al.*, 2016).

**Diagnóstico e tratamento:** O diagnóstico das infecções por RV normalmente é feito depois que se diagnostica GEA como causa da diarreia. O alto nível de vírus durante a fase aguda da doença facilita a detecção de RV em amostras fecais e permite a aplicação de uma variedade de métodos de diagnóstico (Fischer & Gentsch, 2004). À maioria das crianças internadas nos hospitais faz-se o diagnóstico para detecção de RVA. O antígeno do vírus pode ser detetado através de imunoensaio enzimático (ELISA), testes de aglutinação e testes imunocromatográficos no formato de teste rápido que utilizam

anticorpos contra VP6 do grupo A (teste rápido Rota-Strip, CorisConcept). A RT-PCR pode detetar e identificar todas as espécies e serotipos de RV nos humanos (Fischer & Gentsch, 2004).

Atualmente, não existem fármacos antivirais específicos para o tratamento da infeção causada por RV. Normalmente o tratamento é feito pela administração de muita água com um pouco de sal e glicose para restabelecer os líquidos e eletrólitos perdidos, contudo nos casos de desidratação grave podem requerer reidratação intravenosa (Cui *et al.*, 2016). É ainda aconselhada a administração de um suplemento de zinco para diminuir a gravidade e duração da diarreia. No entanto a OMS recomenda o uso de vacinas (Rotateq e Rotarix) como medida essencial na prevenção da doença, o que pode trazer benefícios para a saúde, incluindo redução da hospitalização e mortalidade (Paulo *et al.*, 2016).



### 1.6. Objetivos

#### 1.6.1. Objetivos Geral

Este estudo tem como objetivo determinar a ocorrência das parasitoses intestinais em crianças (sintomáticas e assintomáticas) dos 0-10 anos de idade, seguidas em ambulatório ou no internamento do Hospital Dr. Agostinho Neto, na Cidade da Praia, Cabo Verde.

#### 1.6.2. Objetivos específicos

- ❖ Detetar e identificar parasitas intestinais nas amostras fecais das crianças em estudo.
- ❖ Determinar o grau de parasitismo (monoparasitismo, biparasitismo e poliparasitismo).
- ❖ Relacionar a sintomatologia com as parasitoses encontradas.
- ❖ Correlacionar a existência de parasitoses intestinais com dados sócio-demográficos (idade, sexo, tipo de abastecimento de água, destino de esgoto, colheita de lixo, hábitos de defecação da criança e hábitos de higiene pessoal, presença de animais domésticos e roedores e cuidados com a conservação dos alimentos).
- ❖ Determinar o número de crianças com sintomatologia, no ano em que se realizou o estudo.
- ❖ Relacionar a existência de parasitoses intestinais com o nível de escolaridade do responsável legal/ encarregado de educação da criança.
- ❖ Determinar o número de crianças submetidas a desparasitação no ano que precedeu o estudo.
- ❖ Detetar as espécies de protozoários (*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium*) e *Enterocytozoon bieneusi* através de técnicas de biologia molecular (PCR).
- ❖ Efetuar a deteção de Rotavírus em amostras fecais.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Local e desenho do estudo**

O presente estudo foi desenvolvido em parceria com o Hospital Dr. Agostinho Neto (HAN), nomeadamente, com o Departamento de Pediatria e Laboratório Central, localizado na Cidade de Praia, na Ilha de Santiago, em Cabo Verde. No HAN, a recolha de dados clínicos, epidemiológicos, sócio-demográficos e a colheita das amostras fecais, decorreram nos meses de novembro e dezembro de 2015, e janeiro de 2016, para posteriormente efetuar o diagnóstico parasitológico das amostras no Laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), em Lisboa. Trata-se de um estudo transversal, exploratório, observacional e analítico (SPSS versão 24), que visa determinar a ocorrência de parasitoses intestinais em crianças, através de métodos parasitológicos convencionais e técnicas de biologia molecular.

### **2.2. População e amostra**

A população de estudo é composta por crianças, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 0-10 anos, seguidas no hospital, em ambulatório ou no internamento do Serviço de Pediatria, do HAN. Durante o período em que decorreram as colheitas das amostras fecais, o tamanho da amostra foi de 150 crianças (N=150). De cada criança foram recolhidas duas amostras de fezes em dias alternados.

### **2.3. Critérios de Inclusão**

Todos os participantes abrangidos na amostra, cumpriram os seguintes critérios: a) Foram incluídas as crianças formalmente autorizadas pelos pais/responsáveis legais, e que aceitaram a solicitação da colheita das amostras fecais incluídas na pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CLE) (Anexo A); b) Crianças seguidas no hospital, em ambulatório ou no internamento, com idades compreendidas entre os 0-10 anos (com e sem diarreia, seropositivas e seronegativas para VIH).

### **2.4. Ficha de colheita de dados (Questionário – Anexo B)**

Aos responsáveis legais das crianças, em grupo ou individualmente, foi-lhes prestado esclarecimento sobre o estudo e para cada indivíduo foi aplicado um questionário (Anexo B) que permitiu a recolha de informação epidemiológica, dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais.

### **2.5. Considerações Éticas ou Legais (Anexo C) e Consentimento Livre e Esclarecido**

Este projeto foi submetido e aprovado tanto pelo Comité Nacional de Ética em Pesquisa para a Saúde (CNEPS) do HAN, bem como, pelo Comité de Ética do IHMT. Aos responsáveis legais das crianças envolvidas no estudo, foi-lhes entregue um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CLE), com informação relativa ao estudo a efetuar, que depois de lido foi assinado, autorizando a participação e utilização das amostras biológicas para posterior análise. Foi garantida a confidencialidade das informações clínicas e laboratoriais recolhidas no decorrer de todo o estudo.

### **2.6. Diagnóstico parasitológico e molecular**

#### **2.6.1. Colheita e conservação das amostras fecais**

As amostras fecais foram recolhidas em frascos de plásticos esterilizados, devidamente identificados e efetuadas pelos próprios participantes, pelos familiares ou pelo pessoal de saúde, e sem necessidade de recorrer a estímulo externo. Deste modo, os participantes foram instruídos para realizarem a colheita de duas amostras de fezes em dias alternados. Após a colheita das amostras, estas foram conservadas no frigorífico a 4°C, do Laboratório do HAN.

#### **2.6.2. Diagnóstico parasitológico**

##### **2.6.2.1. Concentração das amostras fecais**

As amostras fecais foram concentradas, através do Método de sedimentação difásica de Ritchie (modificado e adaptado por Casemore *et al.*, 1985), de forma a potenciar a deteção

de ovos, quistos e trofozoítos dos parasitas (Anexo D). Este processo foi efetuado no Laboratório do HAN. As amostras assim concentradas vieram também facilitar o seu transporte para o IHMT. Este método permite concentrar os ovos, quistos, trofozoítos e esporos através da sedimentação por centrifugação.

### **2.6.2.2. Exame direto com coloração por solução de Lugol**

A deteção e identificação de quistos, e trofozoítos de protozoários, assim como de ovos de helmintas nas amostras fecais, após concentração, foram efectuadas com recurso a microscopia ótica. Inicialmente, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, adicionou-se uma gota do primeiro sedimento da amostra resultante do procedimento anterior (2.6.2.1; Anexo D) a uma gota da solução de lugol (Merck, Alemanha), e colocou-se entre lâmina e lamela. As lâminas assim preparadas foram observadas ao microscópio ótico (Zeiss, Alemanha) com as objetivas de 20x e 40x.

### **2.6.2.3. Coloração de Ziehl-Neelsen modificado (adaptado de Casemore *et al*, 1985)**

As amostras de fezes sugestivas de uma eventual presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., por exame direto e/ou por ter sido referido no questionário a presença de diarreia como sintoma, foram analisadas através do método de Ziehl-Neelsen modificado (adaptado de Casemore *et al*, 1985) (Anexo E). Foi feito um esfregaço de cada amostra de fezes com o segundo sedimento, obtido em 2.6.2.1, e procedeu-se à sua coloração. Nesta coloração as paredes dos oocistos aparecem refringentes a rodear a estrutura interna, a qual cora de rosa a vermelho brilhante contra um fundo verde, e cuja morfologia varia entre uma massa amorfa a estruturas esporuladas múltiplas em forma crescente (Casemore *et al.*, 1985).

## **2.6.3. Diagnóstico molecular**

### **2.6.3.1. Extração de DNA**

Para a extração de DNA genómico dos quistos de *G. duodenalis*., dos oocistos de *Cryptosporidium* spp. e dos esporos de *E. bieneusi*, a partir das amostras fecais concentradas pelo método de Ritchie modificado (referido em 2.6.2.1), utilizou-se um

protocolo comercial *QIAamp Fast DNA Stool Mini kit*” (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo F).

### 2.6.3.2. *Nested-PCR*

As metodologias microscópicas, em muitos casos carecerem de suficiente sensibilidade na detecção de parasitas nas amostras a estudar, assim como não permitem a identificação específica dos agentes patogénicos envolvidos. Assim, neste estudo, todas as amostras fecais foram submetidas à amplificação sequencial dos *loci*  $\beta$ -giardina, SSU rRNA e ITS rRNA, de *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp e do microsporídeo - *Enterocytozoon bieneusi*, respetivamente, através da técnica de *nested-PCR*. A aplicação dos métodos moleculares ao diagnóstico dos referidos parasitas tem como objetivos potenciar a detecção e identificação do maior número de amostras positivas, e ainda ser usado para confirmação dos resultados obtidos no diagnóstico parasitológico. A técnica de *nested-PCR* foi usada para a detecção de DNA de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp e *E. bieneusi*. A vantagem do uso desta variante à técnica de PCR simples, consiste em promover a sensibilidade e especificidade. Esta abordagem da técnica de PCR traduz-se fundamentalmente na realização de duas reações de amplificação consecutivas, utilizando para o efeito dois pares de oligonucleótidos iniciadores distintos. A designação *nested* deriva do facto de se utilizarem dois pares de oligonucleótidos iniciadores na amplificação de um único *locus*: o primeiro par é usado na primeira parte desta técnica, que decorre como qualquer PCR de uma só fase; o segundo par liga-se aos fragmentos amplificados na primeira parte, resultando desta amplificações de menor tamanho.

#### 2.6.3.2.1. Amplificação do gene $\beta$ -giardina

Neste estudo utilizou-se o gene que codifica a  $\beta$ -giardina para detecção molecular de DNA de *Giardia* através da amplificação de um fragmento do gene-alvo, por *nested-PCR* (Cacció *et al.*, 2002). A aplicação de um método de genotipagem baseado na análise da sequência de um único *locus*, como a  $\beta$ -giardina, exclusivo deste parasita e com elevada heterogeneidade sequencial, possibilita obter uma elevada resolução semelhante a genotipagem de sequências com vários *loci* (Lalle *et al.*, 2005). Para este procedimento foram utilizados vários oligonucleótidos iniciadores que diferem no seu tamanho e sequência nucleotídica (Quadro 1).

**Quadro 1:** Características dos oligonucleótidos iniciadores para a  $\beta$ -giardina usados nas duas etapas de *nested*-PCR.

Oligonucleótidos iniciadores	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Ref <sup>a</sup>
GIAFW1 GIARV1	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGA	753	Cacciò <i>et al.</i> , 2002
GIAFW2 GIARV2	GAACGAACGAGATCGAGGTCC GCTCGACGAGCTTCGTGTT	511	Lalle <i>et al.</i> , 2005

O procedimento de amplificação da primeira reação de PCR foi efetuado num volume de 25  $\mu$ l contendo 5  $\mu$ l de 10X tampão de reação (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores (GiaFW1 e GiaRV1) (MWG Biotech), 0,02 mg de albumina do soro bovino ou BSA (BSA, em inglês *bovine serum albumine*) (Sigma-Aldrich), 1,5 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase (Bioline), e 3  $\mu$ l de DNA genômico obtido após extração pelo método de “*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*” (QIAGEN, Alemanha) e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. A segunda reação foi processada com 4  $\mu$ l do DNA amplificado da primeira reação, sendo a mistura reacional igual à primeira, com exceção dos oligonucleótidos iniciadores (GiaFW2 e GiaRV2). Posteriormente, todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (*Eppendorf*, Alemanha) com o propósito de homogeneizar a mistura reacional resultante. Em cada reação de PCR utilizou-se um tubo com uma amostra de DNA de *G. duodenalis* em condições ótimas de qualidade e concentração, como controlo positivo, e como controlo negativo o DNA foi substituído por água esterilizada, de modo a detetar possíveis contaminações. Os tubos de PCR de ambas as reações foram processadas sequencialmente no termociclador (T1 Thermocycler; Biometra), e submetidas ao passo de desnaturação inicial a 95 °C durante cinco minutos, seguida de 35 ciclos das fases de desnaturação (95°C), 45 segundos, de ligação (49°C), 45 segundos, e de extensão (72°C), um minuto. A fase de extensão final foi efetuada a 72 °C durante dez minutos. As condições de amplificação na primeira e segunda reação são iguais. Todos os

procedimentos foram realizados numa câmara de segurança biológica de classe II (FASTER UltraSafe 48, Itália) para minimizar ao máximo possíveis contaminações.

### **2.6.3.2.2. Amplificação de DNA genómico de *Cryptosporidium* spp. por *nested*-PCR do *locus* SSU rRNA.**

O diagnóstico molecular de *Cryptosporidium* com base na amplificação de um fragmento do *locus* SSU rRNA foi efetuado através da aplicação da técnica de *nested*-PCR. A sequência-alvo deste gene embora apresente um elevado grau de conservação, revela, porém, alguma variabilidade para a identificação de espécies e genótipos de *Cryptosporidium* (Xiao *et al.*, 1999a, 1999b). A aplicação desta técnica poderá permitir a confirmação dos resultados obtidos na análise parasitológica das amostras fecais.

Na primeira reação de amplificação de DNA utilizaram-se os oligonucleótidos iniciadores CrySSU1 e CrySSU2 (Quadro 2) os quais amplificam um fragmento que contém a sequência alvo do gene SSU rRNA (Xiao *et al.*, 1999a, 2000b). A primeira reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25 µl contendo 2,5 µl 10 × tampão de reação (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,4 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Applied Biosystems), 5 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, 0,01 mg de BSA (Fermentas, Reino Unido), 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 3 µl de DNA genómico e água desionizada estéril para completar o volume final. Posteriormente, todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (Eppendorf, Alemanha) com o objetivo de homogeneizar a mistura de reação obtida. Na segunda reação de amplificação utilizou-se o par de oligonucleótidos iniciadores CrySSU3/CrySSU4 (Quadro 2), os quais se ligam às extremidades da amplificação obtida da primeira reação, o que resulta na amplificação de um segundo fragmento de dimensões mais reduzidas (Xiao *et al.*, 1999a). A segunda reação de amplificação foi processada com 4,5 µl de produto de PCR da primeira reação e recorreu-se aos mesmos reagentes nas mesmas concentrações para realizar a mistura reacional.

**Quadro 2:** Sequência dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação de um fragmento do gene SSU rRNA e tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Oligonucleótidos iniciadores	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Ref <sup>a</sup>
SSU rRNA	CrySSU1	TTCTAGAGCTAATACATGCG	≈ 1325	Xiao <i>et al.</i> , 1999a
	CrySSU2	CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		Xiao <i>et al.</i> , 2000b
	CrySSU3	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG	≈831-838*	Xiao <i>et al.</i> , 1999 <sup>a</sup>
	CrySSU4	AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA		

\*O tamanho do fragmento varia de acordo com espécie e/ou genótipo de *Cryptosporidium*; ≈ tamanho aproximado.

Ambas as reações de PCR foram processadas sequencialmente no termociclador (T1 Thermocycler Biometra, Alemanha) e submetidas ao passo de desnaturação inicial a 95 °C durante cinco minutos, seguida de 35 ciclos das fases de desnaturação (94°C), 45 segundos, de ligação (56°C), 45 segundos, e de extensão (72°C), um minuto. A fase de extensão final foi efetuada a 72 °C durante dez minutos. As condições de amplificação na primeira e segunda reação são iguais.

Em cada reação de PCR foram utilizadas uma amostra com DNA de *Cryptosporidium* spp. em condições ótimas de qualidade e concentração, que funcionou como controlo positivo, e uma amostra com água desionizada estéril em vez de DNA, que funcionou como controlo negativo, permitindo, verificar a existência de possíveis contaminações devido a DNA exógeno. Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de segurança biológica de classe II (FASTER 48 UltraSafe, Itália) para minimizar ao máximo, possíveis contaminações.

A realização de duas reações de amplificação aumenta significativamente a sensibilidade da reação, o que é extremamente importante quando se pretende detetar oocistos de *Cryptosporidium* spp. uma vez que estes estão geralmente presentes em número muito reduzido nas amostras biológicas (Morgan & Thompson, 1998).

#### 2.6.3.2.3. Amplificação de DNA genómico de *Enterocytozoon bienersi*.

A amplificação de um fragmento que contém parte da região SSU, a totalidade da região ITS, e parte da LSU do gene rRNA de *E. bienersi* foi efetuada através de *nested*-PCR. Atualmente, os genótipos de *E. bienersi* baseiam-se na heterogeneidade da região ITS do gene do rRNA, uma vez que nesta espécie a região ITS apresenta um elevado grau de



polimorfismo (Mathis *et al.*, 2005). A caracterização genotípica dos isolados de *E. bieneusi* permite clarificar a dinâmica das infecções por este microsporídeo, nos diferentes hospedeiros. No quadro 3 encontram-se descritas as sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados.

**Quadro 3:** Características dos oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação do gene ITS- rRNA por *nested*-PCR.

Gene	Oligonucle- ótidos iniciadores	Sequência 5' – 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Ref <sup>a</sup>
ITS- rRNA	MLLF1	CGCCCGTCACTATTTTCAGAT	514	Lobo <i>et al.</i> , 2012
	MLL R1	GCTTAAGTCCAGGGAGTATCCA		
	MLLF2	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	386	Lobo <i>et al.</i> , 2012
	MLL R2	GGA CTT TTC GCA TTC TTT CG		

A primeira reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25 µl, contendo 1× tampão de reação (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris- HCL [pH 8,8], 0,01% tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada oligonucleótido iniciador (MLLF1 E MLLR1 na 1<sup>a</sup> parte; MLLF2 e MLLR2 na 2<sup>a</sup> parte; MWG Biotech), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Bioline), 0,75 U de Biotaq<sup>TM</sup> DNA polimerase (Bioline), 0,01 µg/µl de BSA (SIGMA), 2,5 µl de DNA genómico, obtido após extração e água desionizada estéril, para perfazer o volume final de 25 µl. A segunda reação foi realizada com 4,5 µl do DNA amplificado na primeira reação, sendo a mistura reacional igual à primeira, com exceção da BSA, que foi excluída. Posteriormente, todos os microtubos foram submetidos a um *short spin* na micro-centrífuga 5415 D (Eppendorf, Alemanha) com o propósito de homogeneizar a mistura reacional resultante. Em cada reação de PCR foi incluído um tubo com uma amostra de DNA de *E. bieneusi* em condições ótimas de qualidade e concentração, que funcionou como controlo positivo da mistura reacional e um controlo negativo, como indicador da inexistência de contaminação por DNA exógeno onde, no lugar do DNA, foi adicionada água desionizada estéril. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador (T1 Thermocycler; Biometra) e submetidas ao passo de desnaturação inicial a 95 °C durante cinco minutos, seguida de 30 ciclos das fases de desnaturação (95°C), 50 segundos, de ligação (55°C), 30 segundos, e de extensão (72°C), 30 segundos.

A fase de extensão final foi efetuada a 72 °C durante dez minutos. As condições de amplificação na primeira e segunda reação são iguais.

### 2.6.3.3. Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação da segunda reação da *nested*-PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% de acordo com o procedimento descrito no Anexo G. Depois da aplicação dos produtos de PCR e do marcador molecular submeteu-se o gel a uma corrente elétrica. A visualização, dos produtos de amplificação no gel, efetuou-se sob a iluminação ultravioleta (UV), no transiluminador (Vilber Lourmat, França), devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA. Os géis foram seguidamente fotografados e as bandas de interesse excisadas do gel e conservadas a 4°C.

### 2.6.3.4. Purificação dos fragmentos amplificados por *nested*-PCR

Para a realização da purificação dos fragmentos amplificados por *nested*-PCR, após a corrida electroforética em gel de agarose, utilizou-se o *Kit “JecQUICK Purification Spin”* (Genomed) de acordo com as instruções do fabricante, que permite a remoção rápida de impurezas e de contaminantes de produtos de PCR. Foram purificados os produtos da segunda reação. Este método de purificação baseia-se no protocolo que se encontra no Anexo H. Após a etapa de purificação, os produtos de PCR serão posteriormente submetidos à técnica de sequenciação de DNA, para a caracterização genética dos fragmentos dos genes-alvo amplificados, durante o estudo.

## 2.7. Diagnóstico para deteção de Rotavírus em amostras fecais

Para a deteção de RV em amostras fecais, utilizou-se o teste rápido *Rota-Strip* (CORIS BioConcept), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Anexo I). Este teste de diagnóstico *in vitro*, baseia-se num sistema imunocromatográfico homogéneo com partículas de ouro coloidal. As tiras possuem uma membrana de nitrocelulose com anticorpos anti-RV. A especificidade do teste deve-se a um anticorpo monoclonal anti-proteínas VP6 do Grupo A (Rotavírus humano).

Quando a tira é mergulhada na fase líquida da suspensão fecal, os conjugados solubilizados migram com a amostra por difusão passiva. Os conjugados e o material da

amostra entram em contacto com o anticorpo monoclonal anti-RV adsorvido sobre a nitrocelulose. Se a amostra contiver RV, o conjugado-rotavírus permanecerá ligado ao anticorpo monoclonal anti-RV. O resultado na linha vermelha é visível até 10 minutos, após colocação da amostra. A solução continua a migrar para encontrar um reagente de controlo que se liga a um conjugado de controlo, produzindo assim uma segunda linha vermelha que confirma que o teste está em ótimas condições de funcionamento permitindo a sua validação.

### 2.8. Definição de amostra positiva

As amostras foram classificadas como positivas ou negativas de acordo com:

- a) a presença ou ausência de quistos e ovos de protozoários e helmintas intestinais;
- b) a presença ou ausência de DNA de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., ou *E. bieneusi*;
- c) a presença de banda avermelhada na linha de controlo (C) e na posição da linha de teste (T) ou apenas na linha de controlo (C), no teste rápido Rota-Strip, para deteção de RV.

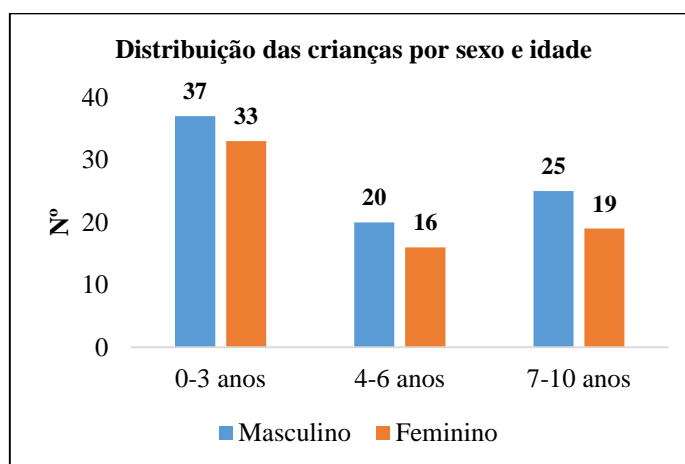
### 2.9. Análise estatística dos Dados

Os dados epidemiológicos foram analisados com recurso ao programa SPSS, versão 24.0 (SPSS, Chicago, USA). A análise e comparação das variáveis foi efetuada com recurso ao teste de Qui-quadrado e ao teste exato de Fisher, tendo sido considerado o limite de significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterização sociodemográfica e clínica da população em estudo

Das 150 crianças que participaram no estudo, realizado no Hospital Dr. Agostinho Neto, na cidade da Praia, 54,7% (82/150) pertenciam ao sexo masculino e 45,3% (68/150) ao sexo feminino. As crianças apresentavam idades compreendidas entre os 0-10 anos, verificando-se uma média de idade de 4,53. No total das 150 crianças, 144 entregaram duas amostras de fezes em dias alternados e 6 entregaram apenas uma amostra de fezes. As medidas de localização e dispersão para as variáveis idade e dias de entrega das fezes das crianças encontram-se apresentadas do quadro do Anexo J. A distribuição das crianças por sexo e idade pode ser observada no Gráfico 1.



**Gráfico 1:** Distribuição das crianças estudadas no Hospital Dr. Agostinho Neto por sexo e por idade.

No Quadro 4, encontram-se sumarizados os dados sociodemográficos da população de crianças estudadas.

**Quadro 4:** Dados sociodemográficos das crianças que participaram no estudo.

Dados sociodemográficos		Nº de crianças (N= 150) n (%)	
<b>Género</b>	Masculino		82 (54,7)
	Feminino		68 (45,3)
<b>Idade (anos)</b>	0-3		70 (46,7)
	4-6		36 (24,0)
	7-10		44 (29,3)
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		120 (80,8)
	Pai		13 (8,7)
	Outro		17 (11,3)
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,3)
	Ensino básico		47 (31,3)
	Ensino secundário		75 (50,0)
	Ensino superior		26 (17,3)
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		125 (83,3)
	Apartamento		25 (16,7)
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		16 (10,7)
	Casa de banho		102 (68,0)
	Fralda		32 (21,3)
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	74 (49,3)
		Sim	76 (50,7)
	Céu-aberto	Não	127 (84,7)
		Sim	23 (15,3)
	Fossa	Não	100 (66,7)
		Sim	50 (33,3)
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	44 (29,3)
		Sim	106 (70,7)
	Poço	Não	87 (58,0)
		Sim	63 (42,0)
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	17 (11,3)
		Sim	133 (88,7)
<b>Colheita de lixo</b>		Não	5 (3,3)
		Sim	145 (96,7)
<b>Roedores junto á casa</b>		Não	69 (46,0)
		Sim	81 (54,0)
<b>Animais domésticos</b>		Não	75 (50,0)
		Sim	75 (50,0)
		Cão e/ou gato	64 (42,7)
		Cão e /ou gato e outro	9 (6,0)
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Outro (coelho, porco, galinhas)	2 (1,3)

Dos encarregados de educação que acompanharam as crianças e que responderam ao questionário, 80,0% (120/150) eram mães das crianças. Relativamente ao grau de escolaridade dos encarregados de educação, observou-se que 50,0% (75/150) frequentaram o ensino secundário, 31,3% (47/150) o ensino básico, 17,3% (26/150) o ensino superior e 1,3% (2/150) eram analfabetos. De acordo com o nosso estudo o tipo de casa foi classificado em térrea ou apartamento, em que 83,3% (125/150) das crianças

habitavam em casas térreas e as restantes 16,7% (25/150) em apartamentos. No que diz respeito às condições de saneamento básico, que envolve as atividades de recolha e tratamento de esgoto, limpeza urbana, gestão de resíduos sólidos e o abastecimento de água potável, encontravam-se disponível na maioria das habitações das crianças estudadas. Sendo que as habitações apresentavam rede de esgoto (50,7%; 76/150) e fossa (33,3%;50/150) como principais destinos de esgoto. As fontes principais de água potável referidas no questionário foram água canalizada (70,7%;106/150) e poço (42 %;63/150). Quanto à conservação de alimentos, 88,7% (133/150) tinham frigorífico em casa. Em 96,7% (145/150) das habitações das crianças, era efetuada a recolha do lixo. A maioria das crianças (68%; 102/150), tinham o hábito de defecar na casa de banho, no entanto 21,3% (32/150) ainda utilizavam a fralda e 10,7% (16/150) faziam as suas necessidades nas proximidades da casa. Das 68% (102/150) crianças que tinham hábito de defecar na casa de banho, 97,1% (99/102) lavavam as mãos após defecar. Do total de crianças em estudo, 50,0% (75/150) tinham animais domésticos, sendo que a maioria (85,3%; 64/75) tinham cão e/ou gato. Verificou-se a presença de roedores em redor de 54,0% (81/150) das habitações.

No Quadro 5, encontram-se sumarizados os dados clínicos da população de crianças estudadas.

**Quadro 5:** Dados clínicos das crianças que participaram no estudo.

Dados clínicos		Nº de crianças (N=150)	
			n (%)
Imunossupressão		Não	148 (98,7)
		Sim	2 (1,3)
Sintomatologia	Vômitos	Não	88 (92,0)
		Sim	12 (8,0)
	Febre	Não	128 (85,3)
		Sim	22 (14,7)
	Diarreia	Não	125 (83,3)
		Sim	25 (16,7)
	Dor de cabeça	Não	103 (68,7)
		Sim	47 (31,3)
	Dor abdominal	Não	73 (48,7)
		Sim	77 (51,3)
Tratamento antiparasitário		Não	91 (60,7)
		Sim	59 (39,3)

Relativamente ao sistema imunitário dos participantes, 98,7% (148/150) eram imunocompetentes e 1,3% (2/150) apresentaram imunossupressão, sendo que uma das

crianças se encontrava infetado por VIH e a outra sujeita a quimioterapia. Do total de crianças estudadas, 70,0% (105/150) eram sintomáticos e 30,0% (45/150) assintomáticos. De entre a presença de sintomatologia, verificou-se que o sintoma mais frequente foi a dor abdominal, presente em 51,3% (77/150) das crianças estudadas (Gráfico 2). Do total das crianças em estudo, 39,3% (59/150) referiram no questionário ter lhes sido administrado anti-helmíntico no ano que precedeu o estudo, e 60,7% (91/150) até à data deste estudo não tinham sido submetidas a este tratamento (Gráfico 3).

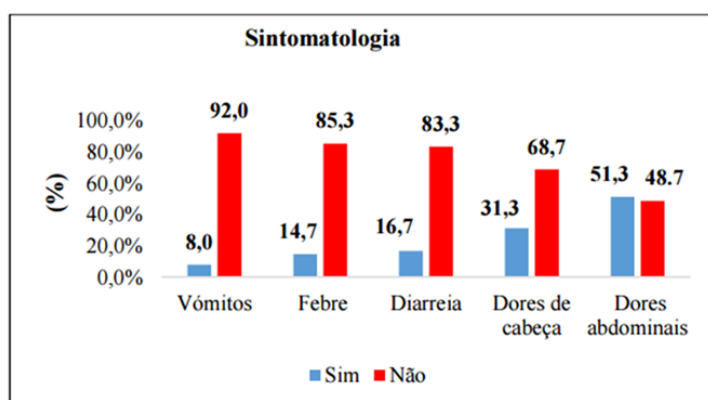


Gráfico 2: Sintomatologia presente nas crianças estudadas.

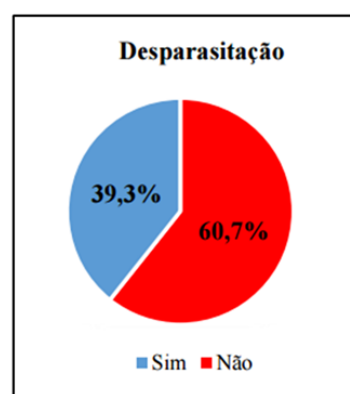


Gráfico 3: Percentagem de crianças submetidas a desparasitação no ano que precedeu o estudo.

### 3.2. Diagnóstico parasitológico e molecular

Os resultados do diagnóstico parasitológico e/ou molecular encontram-se resumidos nos Quadros 6 e 7.

Todas as amostras fecais foram analisadas parasitologicamente por microscopia ótica após concentração. As amostras fecais também foram sujeitas a diagnóstico molecular, através da técnica de *nested*-PCR tendo como alvo os genes  $\beta$ -giardina, SSU RNA e ITS-rRNA, para a deteção de DNA dos seguintes parasitas: *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. bienersi*, respetivamente. Apesar da classificação taxonómica mais recente apontar os microsporídeos como fungos, atendendo às suas inúmeras características de protozoários, a espécie *E. bienersi* foi incluída no grupo dos protozoários, durante a análise de resultados, neste estudo.

**Quadro 6:** Resultados do diagnóstico parasitológico e/ou molecular realizado às amostras fecais das 150 crianças estudadas.

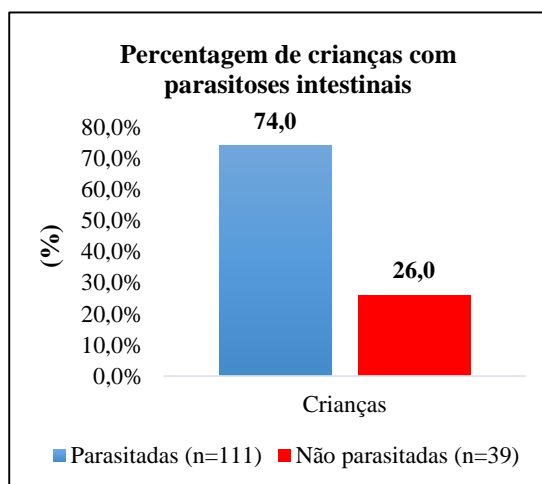
	Microscopia e/ou PCR n (%)
<b>N=150</b>	
<b>Negativo</b>	39 (26,0)
<b>Positivo</b>	111 (74,0)
<b>Protozoários</b>	99 (66,0)
<b>Helmintas</b>	2 (1,3)
<b>Protozoários e helmintas</b>	10 (6,7)
<b>Monoparasitismo</b>	72 (48,0)
<b>Biparasitismo</b>	35 (23,3)
<b>Poliparasitismo</b>	4 (2,7)

**Quadro 7:** Distribuição dos parasitas intestinais identificados por microscopia ótica e/ou PCR nas fezes das crianças estudadas.

	Diagnóstico parasitológico Microscopia ótica n (%)	Diagnóstico molecular nested-PCR n (%)
<b>N=150</b>		
<b>Protozoários</b>		
<i>E. histolytica</i> <i>E. dispar</i>	4 (2,7)	ND
<i>E. coli</i>	6 (4)	ND
<i>I. bütschlii</i>	1 (0,7)	ND
<i>E. hominis</i>	1 (0,7)	ND
<i>B. hominis</i>	104 (69,3)	ND
<i>G. duodenalis</i>	16 (10,7)	4 (2,7)*
<i>Cryptosporidium</i> spp.	0 (0,0)*	2 (1,3)**
<b>Microsporídeos</b>		
<i>E. bienersi</i>	0 (0,0)	8 (5,3)***
<b>Helmintas</b>		
<i>A. lumbricoides</i>	7 (4,7)	ND
<i>H. nana</i>	5 (3,3)	ND

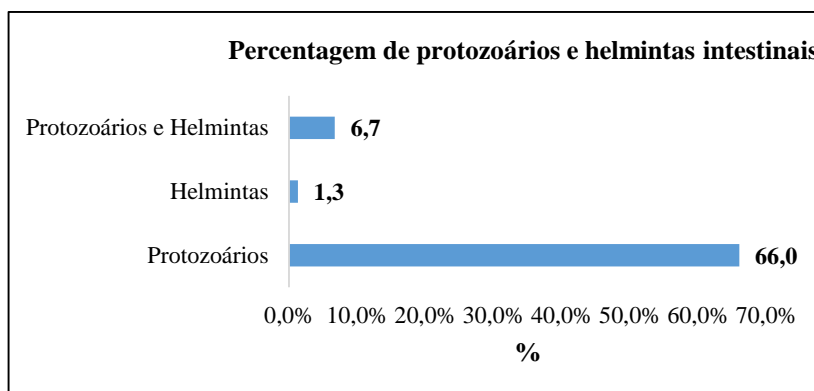
ND: não determinado; \*coloração Ziel-Neelsen; \*\* nested-PCR (gene  $\beta$ -giardina);  
 \*\* nested-PCR (locus: SSU RNA); \*\*\* nested-PCR com (locus: ITS-rRNA).

No presente estudo, com base nas técnicas parasitológicas e/ou moleculares aplicadas, verificou-se que o número de crianças parasitadas foi bastante superior (74,0%; 111/150), ao número de crianças não parasitadas (26,0%; 39/150) (Gráfico 4).

**Gráfico 4:** Percentagem de crianças parasitadas e não parasitadas que participaram no estudo.

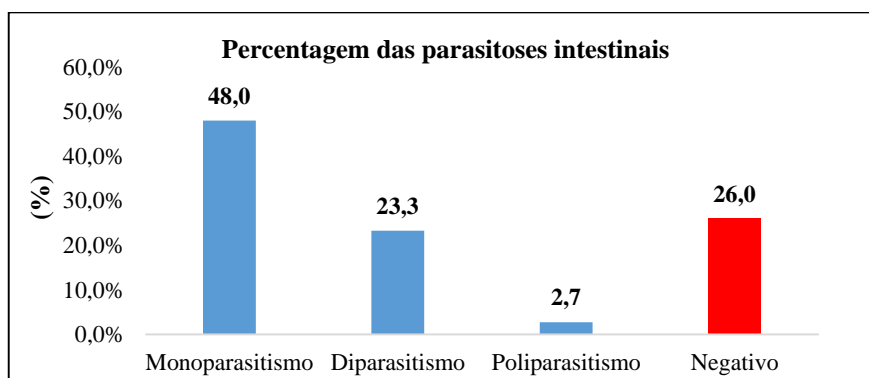
O estudo demonstrou uma percentagem, de infecção por protozoários superior à de helmintas, onde 66,0% (99/150) das crianças encontravam-se parasitadas por protozoários, 1,3% (2/150) por helmintas e 6,7% (10/150) por co- infecção de protozoários e helmintas (Gráfico 5).



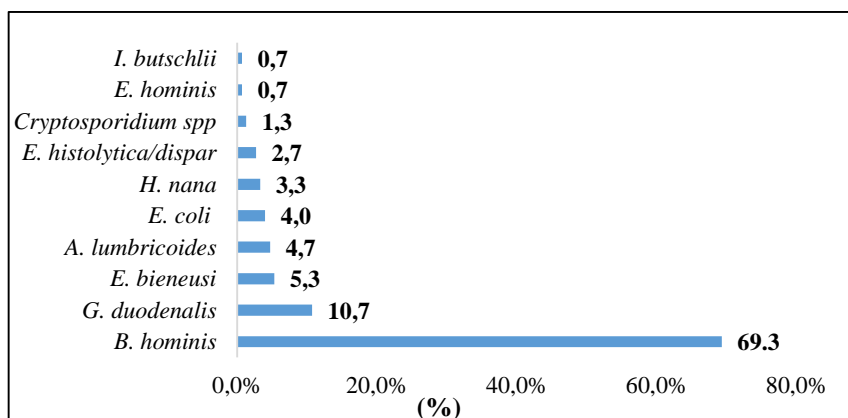


**Gráfico 5:** Percentagem de protozoários, helmintas e associação entre protozoários e helmintas identificadas por microscopia ótica e/ou por *nested*-PCR nas crianças parasitadas que participaram no estudo.

De entre as crianças parasitadas (74,0%; 111/150) verificou-se que a maioria (48,0%; 72/150) se encontrava parasitada por uma espécie de parasita (monoparasitismo) (Gráfico 6). No total das espécies identificadas nas amostras fecais, *Blastocystis hominis* foi o protozoário mais frequente (69.3%; 104/150), sendo que para *Enteromonas hominis* e *Iodamoeba bütschlii* foram identificadas apenas em 0.7% das amostras estudadas (Gráfico 7).



**Gráfico 6:** Percentagem das parasitoses intestinais identificadas por microscopia ótica e/ou por *nested*-PCR nas crianças estudadas.

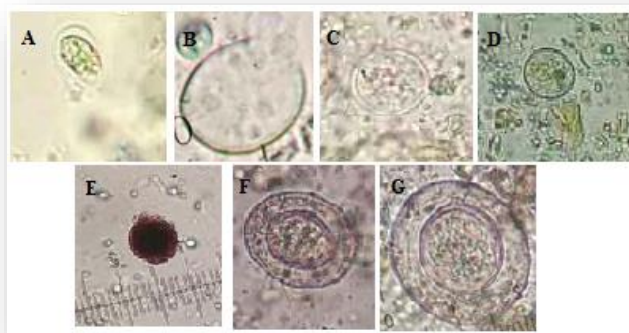


**Gráfico 7:** Percentagem de espécies de parasitas intestinais identificadas por microscopia ótica e/ou por *nested*-PCR nas crianças que participaram no estudo.

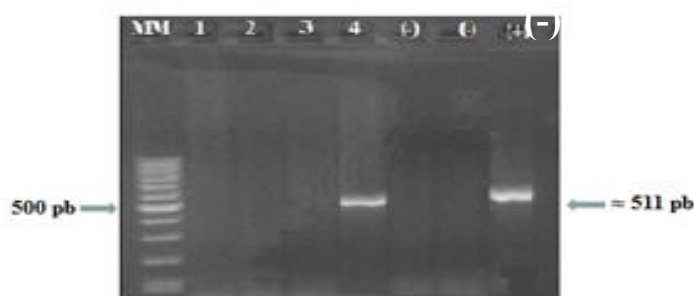
As espécies de protozoários e helmintas identificadas encontram-se apresentados no Quadro 8 e na Figura 14. As electroforeses dos fragmentos amplificados dos genes  $\beta$ -giardina, SSU RNA e ITS-rRNA das espécies *G. dudodenalis*, *Cryptosporidium spp.* e *E. bieneusi* por *nested*-PCR, através do DNA genómico obtido a partir das amostras fecais, encontram-se ilustradas nas Figuras 15,16 e 17.

**Quadro 8:** Percentagem de crianças parasitadas por espécies de protozoários, helmintas e associação entre protozoários e helmintas.

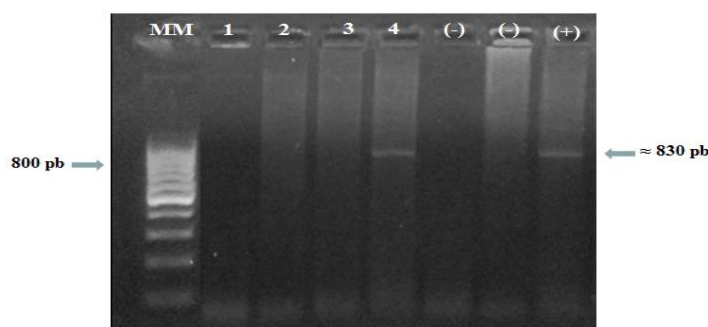
Infeção por protozoários	Nº de crianças n (%)
<i>B. hominis</i>	65 (43,33)
<i>G. duodenalis</i>	1 (0,67)
<i>E. histolytica/dispar</i>	2 (1,33)
<i>E. coli</i>	1 (0,67)
<i>E. bieneusi</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>G. duodenalis</i>	14 (9,33)
<i>B. hominis</i> + <i>G. duodenalis</i> + <i>E. bieneusi</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. histolytica/dispar</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. coli</i>	3 (2,00)
<i>B. hominis</i> + <i>E. coli</i> + <i>E. bieneusi</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. coli</i> + <i>Iodamoeba butchilli</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. hominis</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. bieneusi</i>	5 (3,33)
<i>B. hominis</i> + <i>Cryptosporidium spp.</i>	1 (0,67)
<i>B. hominis</i> + <i>E. histolytica/dispar</i> + <i>Cryptosporidium spp.</i>	1 (0,67)
<b>Infeção por helmintas</b>	
<i>A. lumbricoides</i>	1 (0,67)
<i>H. nana</i>	1 (0,67)
<b>Infeção por protozoários e helmintas</b>	
<i>B. hominis</i> + <i>A. lumbricoides</i>	6 (4,00)
<i>B. hominis</i> + <i>H. nana</i>	4 (2,70)



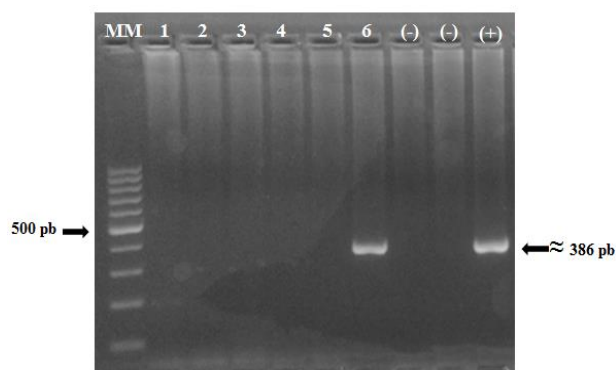
**Figura 14:** (A) Quisto de *G. duodenalis* corado com solução de Lugol; (B) Quisto de *E. coli* corado com solução de Lugol; (C e D) Quistos de *E. histolytica*/*E. dispar* corados com solução de Lugol; (E) Ovo de *A. lumbricoides* corado com solução de Lugol; (F e G) Ovos de *H. nana* corados com solução de Lugol (Fotografias originais da autora).



**Figura 15:** Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene  $\beta$ -giardina de *G. duodenalis* por *nested*-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 4, isolados provenientes de crianças; (-) - controlo negativo sem DNA; (+) - controlo positivo com DNA de *G. duodenalis*; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.



**Figura 16:** Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene SSU rRNA de *Cryptosporidium* spp. por *nested*-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 4, isolados provenientes de crianças; (-) - controlo negativo sem DNA; (+) - controlo positivo com DNA de *C. parvum*; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.



**Figura 17:** Fotografia do gel de agarose a 1,5% após electroforese dos produtos de amplificação do fragmento do gene ITS-rRNA de *E. bieneusi* por nested-PCR. Amostras submetidas a amplificação: Poços 1 a 6, isolados provenientes de crianças; (-) controle negativo sem DNA; (+) - controle positivo com DNA de *E. bieneusi*; MM, Marcador de massa molecular de 100pb.

### 3.3. Infecção parasitária e fatores sociodemográficos e ambientais

Das 111 crianças parasitadas constatou-se que 54,1% (60/111) crianças eram do sexo masculino e 45,9% (51/111) do sexo feminino. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção parasitária e o género das crianças estudadas ( $p=0,853$ ) (Quadro 9). No entanto, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de parasitas e a idade das crianças ( $p=0,013$ ), sendo que a maior percentagem (39,6%; 44/111) de crianças parasitadas foi verificada na faixa etária dos 0-3 anos (Quadro 9). Quanto ao grau de escolaridade dos encarregados de educação das crianças parasitadas, constatou-se que a maioria tinha efetuado o ensino secundário, com 50,5% (56/111). Entre o grau de escolaridade dos encarregados de educação e a presença de infecção parasitária nas crianças, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,799$ ) (Quadro 10).

**Quadro 9:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o género e idade.

	Infecção parasitária		Sig.P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
<b>Género</b>			
Masculino	22 (56,4)	60 (54,1)	0,853*
Feminino	17 (43,6)	51 (45,9)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	
<b>Faixa etária</b>			
0-3	26 (66,7)	44 (39,6)	0,013*
4-6	5 (12,8)	31 (27,9)	
7-10	8 (20,5)	36 (32,4)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos dados.

**Quadro 10:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o grau de escolaridade dos encarregados de educação.

Escolaridade do Encarregado de Educação	Infecção Parasitária		Sig.P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Sem escolaridade	1 (2,6)	1 (0,9)	0,799*
Ensino Primário/básico	13 (33,3)	34 (30,6)	
Ensino Secundário	19 (48,7)	56 (50,5)	
Ensino Superior	6 (15,4)	20 (18,0)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

As crianças que habitavam em casas térreas apresentaram maior percentagem de infecção parasitária, com 80,2% (89/111), relativamente às que viviam em apartamento. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção parasitária e o tipo de casa ( $p=0,132$ ) (Quadro 11).

**Quadro 11:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o tipo de casa.

Tipo de casa	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Térrea	36 (92,3)	89 (80,2)	0,132*
Apartamento	3 (7,7)	22 (19,8)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Dos vários tipos de abastecimento de água, constatou-se que, uma maior percentagem de crianças parasitadas, foi observada nas habitações que possuíam água canalizada, 75,7 % (84/111) (Quadro 12). Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção parasitária e a existência de água canalizada na habitação ( $p=0,027$ ). Foi observada uma maior percentagem de crianças com infecção parasitária nas crianças que não possuíam poço na habitação ( $p=0,005$ ). No que diz respeito à conservação de alimentos, constatou-se que 90,1%(100/111) das crianças parasitadas utilizavam frigorífico na conservação de alimentos, no entanto não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção parasitária e a conservação dos alimentos no frigorífico ( $p=0,383$ ) (Quadro 12).

**Quadro 12:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com a conservação dos alimentos no frigorífico e com o tipo de abastecimento de água.

		Infecção Parasitária		Sig. P*
		Ausência n (%)	Presença n (%)	
Tipo de abastecimento de água	Canalizada	Não	17 (43,6)	0,027*
		Sim	22 (56,4)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
	Poço	Não	15 (38,5)	0,005*
		Sim	24 (61,5)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
Conservação de alimentos no frigorífico		Não	6 (15,4)	0,383**
		Sim	33 (84,6)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Quanto ao destino de esgoto, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças parasitadas e as não parasitadas relativamente ao facto de os encarregados de educação eliminarem as águas residuais em rede de esgoto ( $p=1,000$ ) céu-aberto ( $p=0,309$ ) e fossa ( $p=0,554$ ). Porém, verificou-se que 50,5 % (56/111) das crianças parasitadas tinham como destino de esgoto a rede de esgoto (Quadro 13).

**Quadro 13:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com o destino de esgoto.

Destino de esgoto	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Rede de esgoto	Não 19 (48,7)	55 (49,5)	1,000*
	Sim 20 (51,3)	56 (50,5)	
	<b>Total</b> 39 (100,0)	111 (100,0)	
Céu-aberto	Não 31 (79,5)	96 (86,5)	0,309*
	Sim 8 (20,5)	15 (13,5)	
	<b>Total</b> 39 (100,0)	111 (100,0)	
Fossa	Não 28 (71,8)	72 (64,9)	0,554*
	Sim 11 (28,2)	39 (35,1)	
	<b>Total</b> 39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Nas habitações em que era efetuada a recolha de lixo, observou-se que 97,3% (108/111) das crianças estavam parasitadas e não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas, entre as percentagens de crianças parasitadas quanto à recolha de lixo ( $p=0,605$ ) (Quadro 14).

**Quadro 14:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com a recolha de lixo.

Recolha de lixo	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Não	2 (5,1)	3 (2,7)	0,605*
Sim	37 (94,9)	108 (97,3)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Verificaram-se diferenças significativas entre a presença de infecção parasitária e os hábitos de defecação da criança, sendo que a maior percentagem de crianças parasitadas (74,8%; 83/111) tinham hábito de defecar na casa de banho ( $p=0,002$ ) (Quadro 15). E das 97,1% (99/102) crianças que lavavam as mãos após ir á casa de banho, 73,9% (82/111) se encontravam parasitadas. No entanto, não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas ( $p=0,154$ ) entre a presença de infecção parasitária e a higiene das mãos após ir à casa de banho.

**Quadro 15:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas quanto aos hábitos de defecação.

Hábitos de defecação da criança	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Nas proximidades da casa	4 (10,3)	12 (10,8)	0,002*
Na casa de banho	19 (48,7)	83 (74,8)	
Fralda	16 (41,0)	16 (14,4)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos

Entre as 111 crianças parasitadas, uma menor percentagem (48,6%; 54/111) referiu ter animais domésticos. Não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção parasitária e a presença de animais domésticos nas habitações ( $p=0,710$ ) (Quadro 16). As diferenças entre a presença de infecção parasitária e as espécies de animais domésticos presentes nas habitações das crianças não foram significativas ( $p=0,707$ ). Contudo, a maior percentagem de crianças parasitadas (85,2%; 46/54), verificou-se nas habitações onde existia cão e /ou gato (Quadro 17).

**Quadro 16:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas quanto à presença de animais domésticos em casa.

Animais domésticos	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Não	18 (46,2)	57 (51,4)	0,710*
Sim	21 (53,8)	54 (48,6)	
<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 17:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas de acordo com as espécies de animais domésticos presentes nas habitações.

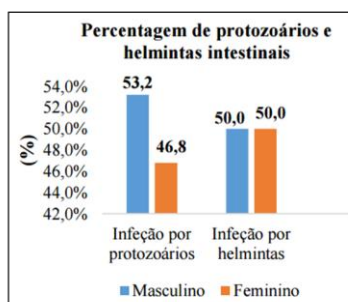
Espécies de animais domésticos	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Cão e/ou Gato	18 (85,7)	46 (85,2)	0,707*
Outro	1 (4,8)	1 (1,9)	
Cão e/ou Gato e Outro	2 (9,5)	7 (13,0)	
<b>Total</b>	21 (100,0)	54 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

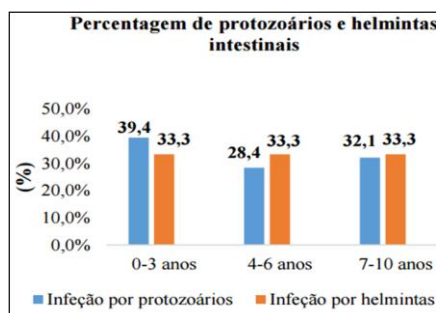
Nos Quadros 18 e 19, encontram-se sumarizados os resultados da distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários e helmintas intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos.

De entre as crianças infetadas por protozoários (72,7%; 109/150), constatou-se que a maioria (53,2%; 58/109) eram do sexo masculino (Gráfico 8). As diferenças entre a presença de infecção por protozoários intestinais e o género das crianças estudadas não

foram estatisticamente significativas ( $p=0,559$ ), no entanto verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção por protozoários intestinais com os hábitos de defecação das crianças ( $p=0,005$ ) (Quadro 18), com a faixa etária ( $p=0,012$ ), sendo que a maior percentagem de crianças infetadas pertencia à faixa etária dos 0-3 anos (Gráfico 9) e com o tipo de abastecimento de água (poço) ( $p=0,012$ ). No que diz respeito à presença de infecção por helmintas intestinais, não se verificou uma associação estatisticamente significativa com o género ( $p=0,735$ ) e com a faixa etária das crianças estudadas ( $p=0,587$ ) (Quadro 19).

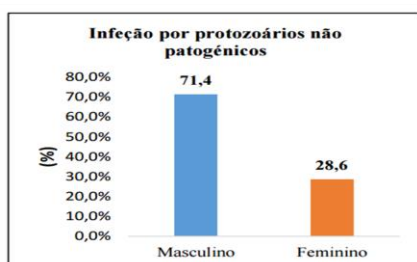


**Gráfico 8:** Distribuição das crianças parasitadas por protozoários e helmintas intestinais de acordo com o sexo.

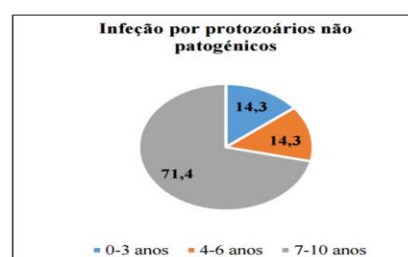


**Gráfico 9:** Distribuição das crianças parasitadas por protozoários e helmintas intestinais de acordo com a idade.

No Quadro 20, encontram-se os resultados da distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários intestinais não patogénicos (*E. coli*, *E. hominis* e *Iodamoeba bütschlii*) de acordo com os fatores sociodemográficos. Do total de crianças estudadas constatou-se que 4,7% (7/150) das crianças estavam parasitadas por protozoários intestinais não patogénicos, sendo que 71,4% (5/7) eram do sexo masculino (Gráfico 10). As diferenças entre a presença de infecção por protozoários intestinais não patogénicos e o género não foram estatisticamente significativas ( $p=0,457$ ) (Quadro 20). Contudo, verificou-se uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,042$ ) no que diz respeito à idade, sendo que a maior percentagem de crianças parasitadas por protozoários não patogénicos (71,4%;5/7) verificou-se na faixa etária dos 7-10 anos ( $p=0,042$ ) (Gráfico 11).



**Gráfico 10:** Distribuição das crianças parasitadas por protozoários não patogénicos de acordo com o sexo.



**Gráfico 11:** Distribuição das crianças parasitadas por protozoários não patogénicos de acordo com a idade.



**Quadro 18:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas por protozoários intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por protozoários intestinais		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		24 (58,5)	58 (53,2)	0,559*
	Feminino		17 (41,5)	51 (46,8)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		27 (65,9)	43 (39,4)	0,012*
	4-6		5 (12,1)	31 (28,4)	
	7-10		9 (22,0)	35 (32,1)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		35 (85,4)	85 (78,0)	0,343**
	Pai		4 (9,8)	9 (8,3)	
	Outro		2 (4,9)	15 (13,8)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		1 (2,4)	1 (0,9)	0,883**
	Ensino básico		13 (31,7)	34 (31,2)	
	Ensino secundário		20 (48,8)	55 (50,5)	
	Ensino superior		7 (17,1)	19 (17,4)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		37 (90,2)	88 (80,7)	0,164*
	Apartamento		4 (9,8)	21 (19,3)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		4 (9,8)	12 (11,0)	0,005*
	Casa de banho		21 (51,2)	81 (74,3)	
	Fralda		16 (39,0)	16 (14,7)	
	<b>Total</b>		41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	20 (48,8)	54 (49,5)	0,934*
		Sim	21 (51,2)	55 (50,5)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	33 (80,5)	94 (86,2)	0,384*
		Sim	8 (19,5)	15 (13,8)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
	Fossa	Não	29 (70,7)	71 (65,1)	0,517*
		Sim	12 (27,3)	38 (34,9)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	16 (39,0)	28 (25,7)	0,110*
		Sim	25 (61,0)	81 (74,3)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
	Poço	Não	17 (41,5)	70 (64,2)	0,012*
		Sim	24 (58,5)	39 (35,8)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	6 (14,6)	11 (10,1)	0,563**
		Sim	35 (85,4)	98 (89,9)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	2 (4,9)	4 (2,8)	0,614**
		Sim	39 (95,1)	106 (97,2)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Roedores junto à casa</b>		Não	18 (43,9)	51 (46,8)	0,752*
		Sim	23 (56,1)	58 (53,2)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Não	18 (43,9)	57 (52,3)	0,360*
		Sim	23 (56,1)	52 (47,7)	
		<b>Total</b>	41 (100,0)	109 (100,0)	
		Cão e/ou gato	20 (87,0)	44 (84,6)	0,614*
		Cão e /ou gato e outro	2 (8,7)	7 (13,5)	
		Outro	1 (4,3)	1 (1,9)	
		<b>Total</b>	23 (100,0)	52 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

\*\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 19:** Distribuição das crianças parasitadas e não parasitadas por helmintas intestinais de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por helmintas intestinais		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		76 (55,1)	6 (50,0)	0,735*
	Feminino		62 (44,9)	6 (50,0)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		66 (47,8)	4 (33,3)	0,587**
	4-6		32 (23,2)	4 (33,3)	
	7-10		40 (29,0)	4 (33,3)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		110 (79,7)	10 (83,3)	0,630**
	Pai		13 (9,4)	0 (0,0)	
	Outro		15 (10,9)	2 (16,7)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,4)	0 (0,0)	0,585**
	Ensino básico		45 (32,6)	2 (16,7)	
	Ensino secundário		67 (48,6)	8 (66,7)	
	Ensino superior		24 (17,4)	2 (16,7)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		114 (82,6)	11 (91,7)	0,691**
	Apartamento		24 (17,4)	1 (8,3)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		14 (10,1)	2 (16,7)	0,402**
	Casa de banho		93 (67,4)	9 (75,0)	
	Fralda		31 (22,5)	1 (8,3)	
	<b>Total</b>		138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	69 (50,0)	5 (41,7)	0,580*
		Sim	69 (50,0)	7 (58,3)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	117 (84,8)	10 (83,3)	1,000**
		Sim	21 (15,2)	2 (16,7)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
	Fossa	Não	90 (65,2)	10 (83,3)	0,339**
		Sim	48 (34,8)	2 (16,7)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	38 (27,5)	6 (50,0)	0,111**
		Sim	100 (72,5)	6 (50,0)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
	Poço	Não	81 (58,7)	6 (50,0)	0,558*
		Sim	57 (41,3)	6 (50,0)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	16 (11,6)	1 (8,3)	1,000**
		Sim	122 (88,4)	11 (91,7)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	4 (2,9)	1 (8,3)	0,345**
		Sim	134 (97,1)	11 (91,7)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Roedores junto á casa</b>		Não	64 (46,4)	5 (41,7)	0,754*
		Sim	74 (53,6)	7 (58,3)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	69 (50,0)	6 (50,0)	1,000*
		Sim	69 (50,0)	6 (50,0)	
		<b>Total</b>	138 (100,0)	12 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	59 (85,5)	5 (83,3)	
		Cão e /ou gato e outro	9 (13,0)	0 (0,0)	
		Outro	1 (1,4)	1 (16,7)	
		<b>Total</b>	69 (100,0)	6 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

\*\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 20:** Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários intestinais não patogênicos de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por protozoários intestinais não patogênicos		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		77 (53,8)	5 (71,4)	0,457*
	Feminino		66 (46,2)	2 (28,6)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		69 (48,3)	1 (14,3)	0,042*
	4-6		35 (24,5)	1 (14,3)	
	7-10		39 (27,3)	5 (71,4)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		115 (80,4)	5 (71,4)	0,425*
	Pai		12 (8,4)	1 (14,3)	
	Outro		16 (11,2)	1 (14,3)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,4)	0 (0,0)	0,635*
	Ensino básico		44 (30,8)	3 (42,9)	
	Ensino secundário		71 (49,7)	4 (57,1)	
	Ensino superior		26 (18,2)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		118 (82,5)	7 (100,0)	0,601*
	Apartamento		25 (17,5)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		15 (10,5)	1 (14,3)	0,453*
	Casa de banho		96 (67,1)	6 (85,7)	
	Fralda		32 (22,4)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	70 (49,0)	4 (57,1)	1,000*
		Sim	73 (51,0)	3 (42,9)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	121 (84,6)	6 (85,7)	0,686*
		Sim	22 (15,4)	1 (14,3)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
	Fossa	Não	96 (67,1)	4 (57,1)	1,000*
		Sim	47 (32,9)	3 (42,9)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	42 (29,4)	2 (28,6)	1,000*
		Sim	101 (70,6)	5 (71,4)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
	Poço	Não	83 (58,0)	4 (57,1)	1,000*
		Sim	60 (42,0)	3 (42,9)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	17 (11,9)	0 (0,0)	1,000*
		Sim	126 (88,1)	7 (100,0)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	5 (3,5)	0 (0,0)	1,000*
		Sim	138 (96,5)	7 (100,0)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Roedores junto á casa</b>		Não	66 (46,2)	3 (42,9)	1,000*
		Sim	77 (53,8)	4 (57,1)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	71 (49,7)	4 (57,1)	1,000*
		Sim	72 (50,3)	3 (42,9)	
		<b>Total</b>	143 (100,0)	7 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	62 (86,1)	2 (66,7)	0,383*
		Cão e /ou gato e outro	8 (11,1)	1 (33,3)	
		Outro	2 (2,8)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	72 (100,0)	3 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Nos quadros 21 e 22 podem ser observadas as distribuições das crianças com e sem infecção por *B. hominis* e *G. duodenalis* de acordo com os fatores sociodemográficos.

Relativamente aos protozoários observados com maior frequência neste estudo (*B. hominis* e *G. duodenalis*) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a ocorrência dos parasitas nas fezes e a presença de animais domésticos nas habitações. No entanto, 84,0% (42/50) ( $p=0,740$ ) das crianças parasitadas por *B. hominis* (Quadro 21) e 87,5% (7/8) ( $p=1,000$ ) por *G. duodenalis* tinham cão e /ou gato (Quadro 22).

De entre as crianças infetadas por *B. hominis*, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infeção por *B. hominis* com o tipo de abastecimento de água (poço) ( $p=0,042$ ) (36,5%; 38/104), com os hábitos de defecação da criança ( $p=0,001$ ), sendo que a maior percentagem de crianças parasitadas (76,0%; 79/104) foi observada nas crianças que tinham por hábito defecar na casa de banho e com o grupo etário estudado ( $p=0,005$ ). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o tipo de abastecimento de água e a presença de infeção por *G. duodenalis* ( $p=0,562$ ), porém 62,5% (10/16) das crianças que se encontravam parasitadas tinham água canalizada como o tipo de abastecimento (Quadro 22).

Nos quadros 23 e 24 podem ser observadas as distribuições das crianças com e sem infeção por *Cryptosporidium* spp. e por *E. bieneusi* de acordo com os fatores sociodemográficos.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infeção por *Cryptosporidium* spp. e por *E. bieneusi* e os fatores sociodemográficos.

**Quadro 21:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *B. hominis* de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por <i>B. hominis</i>		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		26 (56,5)	52 (53,8)	0,859*
	Feminino		20 (43,5)	48 (46,2)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		30 (65,2)	40 (38,5)	0,005*
	4-6		5 (10,9)	31 (29,8)	
	7-10		11 (23,9)	33 (31,7)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		39 (84,8)	81 (77,9)	0,646*
	Pai		3 (6,5)	10 (9,6)	
	Outro		4 (8,7)	13 (12,5)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		1 (2,2)	1 (1,0)	0,887**
	Ensino básico		15 (32,6)	32 (30,8)	
	Ensino secundário		23 (50,0)	52 (50,0)	
	Ensino superior		7 (15,2)	19 (18,3)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		42 (91,3)	83 (79,8)	0,099*
	Apartamento		4 (8,7)	21 (20,2)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		4 (8,7)	12 (11,5)	0,001**
	Casa de banho		23 (50,0)	79 (76,0)	
	Fralda		19 (41,3)	13 (12,5)	
	<b>Total</b>		46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	22 (47,7)	52 (50,0)	0,860*
		Sim	24 (52,2)	52 (50,0)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	37 (80,4)	90 (86,5)	0,461*
		Sim	9 (19,6)	14 (13,5)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
	Fossa	Não	33 (71,7)	67 (64,4)	0,454*
		Sim	13 (28,3)	37 (35,6)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	16 (34,8)	28 (26,9)	0,338*
		Sim	30 (65,2)	76 (73,1)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
	Poço	Não	21 (45,7)	66 (63,5)	0,042*
		Sim	25 (54,3)	38 (36,5)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	6 (13,0)	11 (10,6)	0,781*
		Sim	40 (87,0)	93 (89,4)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	2 (4,3)	3 (2,9)	0,642**
		Sim	44 (95,7)	101 (97,1)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Roedores junto á casa</b>		Não	20 (43,5)	49 (47,1)	0,725*
		Sim	26 (56,5)	51 (52,9)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	21 (45,7)	54 (51,9)	0,479*
		Sim	25 (54,3)	50 (48,1)	
		<b>Total</b>	46 (100,0)	104 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	22 (88,0)	42 (84,0)	0,740**
		Cão e /ou gato e outro	2 (8,0)	7 (14,0)	
		Outro	1 (4,0)	1 (2,0)	
		<b>Total</b>	25 (100,0)	50 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 22:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *G. duodenalis* de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por <i>G. duodenalis</i>		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		73 (54,5)	9 (56,3)	1,000*
	Feminino		61 (45,5)	7 (43,7)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		62 (46,3)	8 (50,0)	0,518**
	4-6		34 (25,4)	2 (12,5)	
	7-10		38 (28,3)	6 (37,5)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		108 (80,6)	12 (75,0)	0,613**
	Pai		12 (9,0)	1 (6,3)	
	Outro		14 (10,4)	3 (17,6)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,5)	0 (0,0)	0,503**
	Ensino básico		40 (29,9)	7 (43,7)	
	Ensino secundário		67 (50,0)	8 (50,0)	
	Ensino superior		25 (18,6)	1 (6,3)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		111 (82,8)	14 (87,5)	0,743**
	Apartamento		23 (17,2)	2 (12,5)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		12 (9,0)	4 (25,0)	0,078**
	Casa de banho		91 (67,9)	11 (68,7)	
	Fralda		31 (23,1)	1 (6,3)	
	<b>Total</b>		134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	65 (48,5)	9 (56,3)	0,605*
		Sim	69 (51,5)	7 (43,7)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	115 (85,8)	12 (75,0)	0,272**
		Sim	19 (14,2)	4 (25,0)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
	Fossa	Não	90 (67,2)	10 (62,5)	0,781*
		Sim	44 (32,8)	6 (37,5)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	38 (28,4)	6 (37,5)	0,562*
		Sim	96 (71,6)	10 (62,5)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
	Poço	Não	80 (59,7)	7 (43,7)	0,286*
		Sim	54 (40,3)	9 (56,3)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	13 (9,7)	4 (25,0)	0,087**
		Sim	121 (90,3)	12 (75,0)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	65 (48,5)	4 (25,0)	1,000**
		Sim	69 (51,5)	12 (75,0)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Roedores junto à casa</b>		Não	65 (48,5)	4 (25,0)	0,110*
		Sim	69 (51,5)	12 (75,0)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	67 (50,0)	8 (50,0)	1,000*
		Sim	67 (50,0)	8 (50,0)	
		<b>Total</b>	134 (100,0)	16 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	57 (85,1)	7 (87,5)	1,000**
		Cão e /ou gato e outro	8 (11,9)	1 (11,1)	
		Outro	2 (3,0)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	67 (100,0)	8 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

\*\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 23:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *Cryptosporidium* spp. de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		80 (54,1)	2 (100,0)	0,501*
	Feminino		68 (45,9)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		69 (46,6)	1 (50,0)	0,724*
	4-6		35 (23,6)	1 (50,0)	
	7-10		44 (29,7)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		118 (79,7)	2 (100,0)	1,000*
	Pai		13 (8,8)	0 (0,0)	
	Outro		17 (11,5)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,4)	0 (0,0)	1,000*
	Ensino básico		46 (31,1)	1 (50,0)	
	Ensino secundário		74 (50,0)	1 (50,0)	
	Ensino superior		26 (17,6)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		123 (83,1)	2 (100,0)	1,000*
	Apartamento		25 (26,9)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		16 (10,8)	0 (0,0)	0,539*
	Casa de banho		101 (68,2)	1 (50,0)	
	Fralda		31 (20,9)	1 (50,0)	
	<b>Total</b>		148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	73 (49,3)	1 (50,0)	1,000*
		Sim	75 (50,7)	1 (50,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	125 (84,5)	2 (100,0)	1,000*
		Sim	23 (25,5)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
	Fossa	Não	99 (66,9)	1 (50,0)	1,000*
		Sim	49 (33,1)	1 (50,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	43 (29,1)	1 (50,0)	0,502*
		Sim	105 (70,9)	1 (50,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
	Poço	Não	86 (58,1)	1 (50,0)	1,000*
		Sim	62 (41,9)	1 (50,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	17 (11,5)	0 (0,0)	1,000*
		Sim	131 (88,5)	2 (10,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	5 (3,4)	0 (0,0)	1,000*
		Sim	143 (96,6)	2 (100,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Roedores junto à casa</b>		Não	67 (45,3)	2 (100,0)	0,210*
		Sim	81 (54,7)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	75 (50,7)	0 (0,0)	0,497*
		Sim	73 (49,3)	2 (100,0)	
		<b>Total</b>	148 (100,0)	2 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	62 (84,9)	2 (100,0)	1,000*
		Cão e /ou gato e outro	9 (12,3)	0 (0,0)	
		Outro	2 (2,7)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	73	2	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 24:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *E. bienersi* de acordo com os fatores sociodemográficos.

Fatores sociodemográficos			Infecção por <i>E. bienersi</i>		
			Ausência n(%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Gênero</b>	Masculino		79 (55,6)	3 (37,5)	0,469*
	Feminino		63 (44,4)	5 (62,5)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Idade (anos)</b>	0-3		67 (47,2)	3 (37,5)	0,255*
	4-6		32 (22,5)	4 (50,0)	
	7-10		43 (30,3)	1 (12,5)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Grau de parentesco</b>	Mãe		113 (79,6)	7 (87,5)	1,000*
	Pai		13 (9,2)	0 (0,0)	
	Outro		16 (11,3)	1 (12,5)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Grau de escolaridade do encarregado de educação</b>	Sem escolaridade		2 (1,4)	0 (0,0)	1,000*
	Ensino básico		44 (31,0)	3 (37,5)	
	Ensino secundário		71 (50,0)	4 (50,0)	
	Ensino superior		25 (17,6)	1 (12,5)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Tipo de casa</b>	Térrea		119 (83,8)	6 (75,0)	0,621*
	Apartamento		23 (16,2)	2 (25,0)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Hábitos de defecação da criança</b>	Proximidades de casa		15 (10,6)	1 (12,5)	0,742*
	Casa de banho		97 (68,3)	5 (62,5)	
	Fralda		30 (21,1)	2 (25,0)	
	<b>Total</b>		142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Destino de esgoto</b>	Rede de esgoto	Não	68 (47,9)	6 (75,0)	0,164*
		Sim	74 (52,1)	2 (25,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
	Céu-aberto	Não	121 (85,2)	6 (75,0)	0,354*
		Sim	21 (14,8)	2 (25,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
	Fossa	Não	96 (67,6)	4 (50,0)	0,442*
		Sim	46 (32,4)	4 (50,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Tipo de abastecimento de água</b>	Canalizada	Não	42 (29,6)	2 (25,0)	1,000*
		Sim	100 (70,4)	6 (75,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
	Poço	Não	82 (57,7)	5 (62,5)	1,000*
		Sim	60 (42,3)	3 (37,5)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Conservação de alimentos</b>	Frigorífico	Não	17 (12,0)	0 (0,0)	0,598*
		Sim	125 (88,0)	8 (100,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Colheita de lixo</b>		Não	5 (3,5)	0 (0,0)	1,000*
		Sim	137 (96,5)	8 (100,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Roedores junto á casa</b>		Não	65 (45,8)	4 (50,0)	1,000*
		Sim	77 (54,2)	4 (50,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
<b>Animais domésticos</b>		Não	69 (48,6)	6 (75,0)	0,276*
		Sim	73 (51,4)	2 (25,0)	
		<b>Total</b>	142 (100,0)	8 (100,0)	
	<b>Espécies de animais domésticos</b>	Cão e/ou gato	62 (84,9)	2 (100,0)	1,000*
		Cão e /ou gato e outro	9 (12,3)	0 (0,0)	
		Outro	2 (2,7)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	73 (100,0)	2 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.



### 3.4. Infecção parasitária e fatores clínicos

De entre as crianças parasitadas, 71,2% (79/111) apresentavam sintomatologia, no entanto as diferenças entre a presença de infecção parasitária e a presença de sintomatologia não foram significativas (Quadro 25).

**Quadro 25:** Distribuição das crianças com e sem infecção parasitária quanto à presença de sintomatologia.

Presença de sintomatologia	Infecção Parasitária		Sig. P*
	Ausência n (%)	Presença n (%)	
Não	13 (33,3)	32 (28,8)	0,685*
Sim	26 (66,7)	79 (71,2)	
<b>Total</b>	<b>39 (100,0)</b>	<b>111(100,0)</b>	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

No Quadro 26, encontram-se sumarizados os resultados da distribuição das crianças com e sem infecção parasitária de acordo com os fatores clínicos.

Do total de crianças parasitadas (74,0%; 111/150), constatou-se que 0,9% (1/111) apresentava imunossupressão. Não se verificou uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infecção parasitária e a presença de imunossupressão ( $p=0,454$ ) (Quadro 26). De entre a sintomatologia apresentada pelas crianças parasitadas, verificou-se que a maior percentagem de infecção parasitária (55,0%; 61/111) foi nas crianças que apresentavam dores abdominais como sintomatologia. No entanto, as diferenças entre a presença de dores abdominais e a presença de infecção parasitária não foram estatisticamente significativas ( $p=0,142$ ). Contudo, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção parasitária e a presença ou ausência de dor de cabeça ( $p=0,015$ ) (Quadro 26).

**Quadro 26:** Distribuição das crianças com e sem infecção parasitária de acordo com os fatores clínicos.

Fatores clínicos		Infecção Parasitária		
		Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Imunossupressão</b>	Não	38 (97,4)	110 (99,1)	0,454*
	Sim	1 (2,6)	1 (0,9)	
	<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	
<b>Sintomatologia</b>	Febre	Não	30 (76,9)	0,113**
		Sim	9 (23,1)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
	Diarreia	Não	32 (82,1)	1,000**
		Sim	7 (17,9)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
	Dores abdominais	Não	23 (59,0)	0,142**
		Sim	16 (41,0)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
	Vômitos	Não	33 (84,6)	0,080*
		Sim	6 (15,4)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
	Dor de cabeça	Não	33 (84,6)	0,015**
		Sim	6 (15,4)	
		<b>Total</b>	39 (100,0)	
<b>Tratamento antiparasitário</b>	Não	29 (74,4)	62 (55,9)	0,056**
	Sim	10 (25,6)	49 (44,1)	
	<b>Total</b>	39 (100,0)	111 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Os resultados da distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários ou helmintas intestinais, e por protozoários não patogênicos, de acordo com os fatores clínicos, encontram-se nos Quadros 27 e 28, respectivamente.

No que diz respeito às crianças infetadas por protozoários intestinais patogênicos e não patogênicos e por helmintas intestinais não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção quanto à presença de imunossupressão e tratamento antiparasitário. No entanto, de entre a sintomatologia apresentada pelas crianças infetadas por protozoários intestinais patogênicos e não patogênicos verificou-se uma associação estatisticamente significativa com a presença e ausência de dor de cabeça.

**Quadro 27:** Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários e helmintas intestinais de acordo com os fatores clínicos.

Fatores clínicos			Infecção por protozoários intestinais			Infecção por helmintas intestinais		
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*	Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
Imunossupressão		Não	40 (97,6)	108 (99,1)		136 (98,6)	12 (10,0)	
		Sim	1 (2,4)	1 (0,9)	1,000*	2 (1,4)	0 (0,0)	1,000*
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	
Sintomatologia	Febre	Não	33 (80,5)	95 (87,2)		117 (84,8)	11 (91,7)	
		Sim	8 (19,5)	14 (12,8)		21 (15,2)	1 (8,3)	1,000*
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)	0,438**	138 (100,0)	12 (100,0)	
	Diarreia	Não	34 (82,9)	91 (83,5)		115 (83,3)	10 (83,3)	
		Sim	7 (17,1)	18 (16,5)	1,000**	23 (16,7)	2 (16,7)	1,000*
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	
	Dores abdominais	Não	24 (58,5)	49 (45,0)		67 (48,6)	6 (50,0)	
		Sim	17 (41,5)	60 (55,0)	0,148**	71 (51,4)	6 (50,0)	0,776**
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	
	Vômitos	Não	35 (85,4)	103(94,5)		126 (91,3)	12 (100,0)	0,600*
		Sim	6 (14,6)	6 (5,5)	0,090*	12 (8,7)	0 (0,0)	
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	
	Dor de cabeça	Não	34 (82,9)	69 (63,3)		94 (68,1)	9 (75,0)	
		Sim	7 (17,1)	40 (36,7)	0,029**	44 (31,9)	3 (25,0)	0,754*
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	
Tratamento antiparasitário		Não	30 (73,2)	61 (56,0)		85 (61,6)	6 (50,0)	
		Sim	11 (26,8)	48 (44,0)	0,062**	53 (38,4)	6 (50,0)	0,541**
		Total	41 (100,0)	109 (100,0)		138 (100,0)	12 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 28:** Distribuição das crianças com e sem infecção por protozoários intestinais não patogênicos de acordo com os fatores clínicos.

Fatores clínicos		Infecção por protozoários não patogênicos			
			Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
Imunossupressão		Não	141 (98,6)	7(100,0)	1,000*
		Sim	2 (100,0)	0(100,0)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
Sintomatologia	Febre	Não	121 (84,6)	7(100,0)	0,594*
		Sim	22 (15,4)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
	Diarreia	Não	119 (83,2)	6 (85,7)	1,000*
		Sim	24 (16,8)	1 (14,3)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
	Dores abdominais	Não	70 (49,0)	3 (42,9)	1,000*
		Sim	73 (51,0)	4 (57,1)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
	Vômitos	Não	131 (91,6)	7(100,0)	1,000*
		Sim	12 (8,4)	0 (0,0)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
	Dor de cabeça	Não	101 (70,6)	2 (28,6)	0,031*
		Sim	42 (29,4)	5 (71,4)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	
Tratamento antiparasitário		Não	88 (61,5)	3 (42,9)	0,434*
		Sim	55 (38,5)	4 (57,1)	
		<b>Total</b>	143(100,0)	7(100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

Foi investigada a possível associação entre a presença de infecção por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica/dispar*, *E. bieneusi* e *B. hominis* e os diversos fatores clínicos, analisados neste estudo. Os resultados da distribuição das crianças com e sem infecção por estes microorganismos encontram-se nos quadros do Anexo k. De entre os protozoários identificados neste estudo, constatou-se que a maior percentagem de crianças infetadas por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica/E. dispar* e *E. bieneusi* foi observada nas crianças que apresentavam dores abdominais como sintomatologia, no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção e a presença de dores abdominais (Anexo k).

Relativamente ao protozoário identificado com maior frequência no estudo (*B. hominis*), constatou-se que 43,3% (65/150) das crianças se encontravam infetadas apenas por *B. hominis*, sendo que 70,8% (46/65), eram sintomáticos, contudo, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças sintomáticas e assintomáticas quanto à presença de infecção por *B. hominis*. Contudo, a maior percentagem de crianças infetadas por *B. hominis* 55,4% (36/65) apresentavam dores abdominais como sintomatologia. No que diz respeito à presença de imunossupressão e tratamento antiparasitário, também não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quanto à presença de infecção por *B. hominis* (Anexo k).

### **3.5. Infecção por rotavírus e fatores sociodemográficos e clínicos**

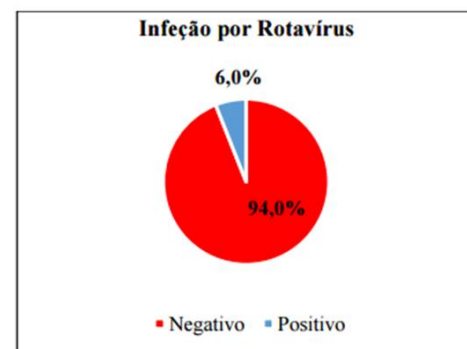
No total das crianças analisadas, verificou-se através do teste rápido imunocromatográfico (Rota-Strip CORIS Bio Concept) que 6% (9/150) encontravam-se infetadas por RV (Gráfico 12). Quanto ao género, constatou-se que a infecção por RV afetou os dois géneros, sendo que 66,7% (6/9) eram do sexo masculino e 33,3% (3/9) do sexo feminino e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção por rotavírus e o sexo das crianças estudadas ( $p=0,512$ ). A infecção por RV, de acordo com a faixa etária foi mais frequente (44,4%; 4/9) nas crianças dos 0-3 anos, seguida pelos valores de 33,3% (3/9) e 22,2% (2/9), nos grupos dos 7 aos 10 anos e dos 4-6 anos, respetivamente. Contudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção por RV e a idade das crianças estudadas ( $p=1,000$ ).

Relativamente à presença de sintomatologia constatou-se que a maior percentagem de crianças infetadas por rotavírus (55,6%; 5/9) apresentavam dores abdominais. No entanto, não se verificou diferenças significativas entre a presença de sintomatologia e a infeção por RV (Quadro 29).

**Quadro 29:** Distribuição das crianças com e sem infeção por rotavírus de acordo com a sintomatologia.

		Infeção por rotavírus		Sig. P*
Sintomatologia		Ausência n (%)	Presença n (%)	
Febre	Não	120 (85,1)	8 (88,9)	1,000*
	Sim	21 (14,9)	1 (11,1)	
	<b>Total</b>	141 (100,0)	9 (100,0)	
Diarreia	Não	117 (82,9)	8 (88,9)	1,000*
	Sim	24 (17,1)	1 (11,1)	
	<b>Total</b>	141 (100,0)	9 (100,0)	
Dores abdominais	Não	69 (48,9)	4 (44,4)	1,000*
	Sim	72 (41,1)	5 (55,6)	
	<b>Total</b>	141 (100,0)	9 (100,0)	
Vômitos	Não	129 (91,5)	9 (100,0)	1,000*
	Sim	12 (8,5)	0 (0,0)	
	<b>Total</b>	141 (100,0)	9 (100,0)	
Dor de cabeça	Não	96 (68,1)	7 (77,8)	0,720*
	Sim	45 (31,9)	2 (22,2)	
	<b>Total</b>	141 (100,0)	9 (100,0)	

\*Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.



**Gráfico 12:** Percentagem de infeção por rotavírus nas crianças estudadas.

Do total de crianças parasitadas, 7,2 % (8/111) encontravam-se infetadas por rotavírus, contudo não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas entre a infeção por rotavírus e a presença de infeção parasitária ( $p= 0,447$ ) (Quadro 30).

**Quadro 30:** Distribuição das crianças com e sem infeção por rotavírus quanto à presença de infeção parasitária.

Infeção parasitária	Infeção por rotavírus		Sig. P*
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Não	38 (97,4)	1 (2,6)	0,447*
Sim	103 (92,8)	8 (7,2)	

\*Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

## 4. Discussão e Conclusões

### 4.1. Discussão

Este estudo teve como objetivo principal, determinar a ocorrência das parasitoses intestinais em crianças (sintomáticas e assintomáticas) dos 0 aos 10 anos, seguidas em ambulatório ou no internamento do Hospital Dr. Agostinho Neto, na Cidade da Praia (Cabo Verde). Os poucos recursos financeiros (26,6% da população total é considerada pobre), o deficiente saneamento básico e uma população constituída por um grande número de crianças e adolescentes (39%), são algumas características que fundamentam a relevância deste estudo (Ministério da Saúde de Cabo Verde, 2007; ONU, 2010). É importante também salientar a escassez de estudos neste âmbito, realizados em Cabo Verde, nomeadamente no que se refere à caracterização molecular de protozoários intestinais.

#### **Diagnóstico parasitológico e molecular**

No decorrer deste trabalho, um total de 294 amostras fecais de 150 crianças foram submetidas a diagnóstico parasitológico de enteroparasitas e molecular através da técnica de *nested*-PCR para a deteção de DNA de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. bienersi* tendo como alvo os genes  $\beta$ -giardina, SSU rRNA e ITS-rRNA, respetivamente. Apesar da classificação taxonómica mais recente apontar os microsporídeos como fungos, atendendo às suas inúmeras características de protozoários, a espécie *E. bienersi* foi incluída no grupo dos protozoários, durante a análise de resultados, neste estudo. No diagnóstico parasitológico das amostras fecais foi utilizada microscopia ótica, que quando comparada com outros métodos (ex: deteção de antigénios e deteção de anticorpos) é a técnica padrão selecionada na maioria dos estudos, apresentando um grau de dificuldade de execução médio a alto (exige treino do observador). Os baixos custos da sua aplicação, a sensibilidade e especificidade médias (dependendo do treino do observador) (Tanyuksel & Petri, 2003; Novak, Mastalska & Loster, 2015) são características vantajosas que tornam esta metodologia de diagnóstico uma ferramenta importante na identificação de parasitas intestinais. Contudo, apresenta diversas limitações, nomeadamente a nível de distinção de espécies de protozoários, que embora possível, não é fácil com base apenas nas

características morfológicas dos quistos e dos trofozoítos (Novak, Mastalska & Loster, 2015).

A população selecionada para este estudo, crianças em idade pré-escolar e escolar, constitui um dos grupos da população referenciada por diversos autores como apresentando maior risco de infecção por parasitas intestinais (Wilson & Sande, 2004; Pasqualotto & Schwarzbald, 2006; Keiser & Utzinger, 2008; Mehraj *et al.*, 2008; Neto *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2015). Não há dúvida de que as crianças, de um modo geral, constituem um grupo de população mais susceptível a parasitoses intestinais, associado a diversos fatores: possuem um sistema imunitário ainda imaturo (o sistema imune é considerado completamente desenvolvido a partir dos sete anos de idade), têm ausência ou práticas de higiene precárias, e têm maior poder de deslocação, podendo circular ativamente por ambientes contaminados por parasitas intestinais (Gonçalves *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2016; Liao *et al.*, 2017). No nosso estudo, as crianças apresentaram uma média de idade de 4,53 anos, ocorrendo uma percentagem ligeiramente inferior das crianças do sexo feminino (45,3% vs 54,7%). Também foi possível recolher informação sobre os encarregados de educação das crianças em estudo, tendo-se verificado que 80,0% dos encarregados eram as mães. Relativamente ao grau de escolaridade dos encarregados de educação, constatou-se que uma minoria, 1,3% não eram alfabetizados, 31,3% frequentaram o ensino básico, 50,0% frequentaram o ensino secundário e 17,3% o ensino superior.

A comparação de prevalências ou percentagens da infecção por parasitas intestinais, entre os vários estudos descritos na literatura é muitas vezes difícil de estabelecer, quer atendendo a diferenças associadas ao tipo de população estudada ou às metodologias usadas para a sua determinação. Em Cabo Verde, são escassos os estudos neste âmbito, sendo que a maioria são realizados por estudantes que têm como principal objetivo a conclusão do grau académico e acabam por ter uma limitada divulgação, uma vez que não chegam a ser publicados em revistas da especialidade. Assim, neste trabalho foi difícil estabelecer comparações entre o nosso estudo e outros estudos previamente realizados em Cabo Verde. Por outro lado, é necessário estabelecer com cuidado possíveis comparações entre os resultados obtidos neste estudo e outros trabalhos publicados noutras regiões, uma vez que, como já foi refeito anteriormente, as diferenças observadas

podem resultar de diferentes características da população estudada e dos métodos de diagnósticos utilizados.

No total das crianças estudadas, a frequência de enteroparasitoses obtida através das técnicas de microscopia ótica e/ou molecular foi de 74,0%, em que 66,0% das crianças encontravam-se parasitadas por apenas protozoários, 1,3% exclusivamente por helmintas e 6,7% simultaneamente por protozoários e helmintas. A percentagem global, de infecção parasitária obtida no presente trabalho foi superior a frequências reportadas em estudos realizados em crianças, em Cabo Verde. Assim, Benzerroug, (2005) num estudo a nível nacional, e de Pires *et al.*, (2010), num estudo realizado no Hospital Regional de Santiago Norte, verificaram taxas de positividade de 49,2% e 48,8%, respetivamente. Contudo, a frequência obtida no presente estudo foi inferior à percentagem de 94,8% descrita no estudo realizado em Rincão-Santiago, por Martins, Pires, & Dias, (2012). Sugere-se que a determinação de uma menor frequência de enteroparasitas descrita no estudo realizado por Benzerroug, (2005) possa estar associada à exclusiva deteção de helmintas intestinais, não tendo tido em conta a percentagem de crianças infetadas por protozoários (frequentemente encontrados nos hospitais). Esta diferença pode também justificar-se pela utilização de diferentes técnicas no diagnóstico dos parasitas, que podem ser mais ou menos sensíveis e específicas consoante o organismo que se pretende detetar. Uma técnica pode ser excelente para detetar determinado parasita, mas inadequada para outro, e também a utilização simultânea de mais do que uma técnica potencia a fiabilidade do resultado final (Chehter & Cabeça, 2010). Segundo Neves *et al.*, (2004) há que ter em conta que cada parasita tem características próprias, sendo por isso importante, os laboratórios clínicos avaliarem quais as metodologias mais adequadas para a sua deteção e/ou empregarem diferentes técnicas no exame parasitológico de fezes de modo a assegurar os melhores resultados. Por outro lado, cada região geográfica tem as suas particularidades socioeconómicas, ambientais e educacionais (Santos *et al.*, 2008).

A maior percentagem de crianças com infecção por protozoários (66,0%), relativamente a infecção por helmintas (1,3%), verificada neste estudo é concordante com estudos realizados por outros autores, que reportaram uma maior prevalência de protozoários em crianças (Eljaq *et al.*, 2009; Aguiar & Fachini, 2010; Silva *et al.*, 2010; Belo *et al.*, 2011; Martins, Pires & Dias, 2012; Kiani *et al.*, 2016). Num estudo realizado em crianças de uma comunidade no Brasil, detetaram 61,4% de protozoários e 1,8% de helmintas (Santos



*et al.*, 2014). À semelhança do estudo realizado por Osman *et al.*, (2016), em crianças no Líbano, também no presente estudo verificou-se a ocorrência de um elevado número de crianças parasitadas por diferentes espécies de protozoários. Estes resultados podem ser explicados pela ocorrência de grande exposição das crianças a diferentes espécies de protozoários que apresentam a mesma via de transmissão (via fecal-oral) quer através das mãos contaminadas ou ingestão de água e alimentos contaminados pelos parasitas (Ghenghesh *et al.*, 2016; Ibarra *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016). Embora em percentagem menor (6,7%), também se verificou neste trabalho a presença de crianças parasitadas simultaneamente por protozoários e helmintas. Uma percentagem idêntica à determinada neste estudo de, 6,7%, também foi observada por Oliveira *et al.*, (2015) em Angola, embora tenha sido estudado um maior número de crianças (328). Esta associação de parasitas é indicador da exposição simultânea a ambientes contaminados por protozoários e por helmintas (Oliveira *et al.*, 2015).

A percentagem global (considerando também as crianças infetadas simultaneamente por protozoários e helmintas) de infeção por helmintas intestinais observada no nosso estudo foi de 8,0%. No entanto, a frequência de infeção exclusivamente por helmintas foi de 1,3% contrariamente ao que se verificou no estudo realizado em crianças, por Martins, Pires, & Dias, (2012), em Rincão-Santiago em que registaram uma percentagem de 26,9%. A baixa frequência de crianças com infeção por helmintas, deverá estar particularmente associada às campanhas de desparasitação regulares, com anti-helmínticos, que são realizadas periodicamente em Cabo Verde, desde 2007. Esta administração regular poderá ter contribuído para a eficácia do medicamento na população estudada, pois tal regularidade é necessária para que se verifique a diminuição da prevalência global da infeção (Capete, Virkel & Lanusse, 2009; Belo *et al.*, 2011). Por outro lado, dado que uma técnica pode ser mais vantajosa para detetar determinados parasitas em detrimento de outros (Chehter & Cabeça, 2010) esta baixa percentagem de helmintas intestinais observada no presente estudo, pode, também, ser justificada pela técnica parasitológica utilizada no diagnóstico mais direcionada para a deteção de protozoários. Eventualmente, sugere-se que a aplicação do método de Kato-Katz seria o método mais adequado para a deteção de helmintas nas fezes em estudo. A não utilização desta técnica, recomendada pela OMS no diagnóstico de geohelmintas, em áreas com taxas de transmissão moderadas a altas, poderá ter influenciado os resultados do

diagnóstico de infecção por helmintas intestinais (Allen, 2008). Igualmente se tivesse sido feita a técnica de corpocultura das amostras para pesquisa de larvas poderia ter potenciado a detecção de ancilostomídeos, visto ser o método mais eficaz para o diagnóstico destes helmintas.

*Blastocystis hominis* (69,3%), *Giardia duodenalis* (10,7%), *E. coli* (4%), *E. histolytica/díspar* (2,7%), *Cryptosporidium* spp. (1,3%) *Iodamoeba butschlii* (0,7%) e *Enteromonas hominis* (0,7%) foram por ordem decrescente, as diversas espécies de protozoários identificadas neste estudo. O microsporídeo *Enterocytozoon bieneusi* foi identificado em 5,3% das amostras das crianças estudadas. Quanto a espécies de helmintas verificou-se a presença de *Ascaris lumbricoides* (4,7) e *Hymenolepis nana* (3,3%).

Neste trabalho, constatou-se que das 74% crianças parasitadas, 48,0% apresentavam uma única espécie de parasita (monoparasitismo), 23,3% duas espécies (biparasitismo) e 2,7% apresentavam três ou mais espécies de parasitas (poliparasitismo) nas fezes. Resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, realizados também em crianças, foram obtidos por Mehraj *et al.*, (2008) no Paquistão, Balci *et al.*, (2009) na Turquia, Ouattara *et al.*, (2010) na Costa de Marfim, Hurlimann *et al.*, (2014), na Costa de Marfim, Mirante *et al.*, 2016 em Angola e Liao *et al.*, (2017), no Camboja. Igualmente, outros autores verificaram o predomínio de monoparasitismo entre a população estudada: no Estado de Amazonas no Brasil, Silva, Silva & Freitas (2012) observaram 55% de monoparasitismo, 37% de biparasitismo e 7,4% de poliparasitismo e Seixas *et al.*, (2011) também no Brasil, reportaram 39% de monoparasitismo, 33% de biparasitismo e 22% de poliparasitismo.

O predomínio de casos de monoparasitismo, pode estar relacionado com diversos fatores, nomeadamente a competição dos parasitas pelo mesmo habitat, a baixa frequência com que o hospedeiro entra em contato com o ambiente contaminado por diferentes espécies e com limitações dos métodos de diagnóstico utilizados (Orlandini & Matsumoto, 2010). Contudo, o hospedeiro humano pode albergar diferentes espécies de parasitas intestinais e se o ambiente em que se insere apresentar elevados níveis de contaminação, pode potenciar o aumento da probabilidade de infetar-se por várias espécies de parasitas (Neves *et al.*, 2011). O poliparasitismo nas crianças observado no nosso estudo, pode estar associado ao facto dos parasitas envolvidos apresentarem a mesma via de transmissão

(via fecal-oral), sendo assim considerados bons indicadores de possíveis fatores de risco (Rocha *et al.*, 2000; Belo *et al.*, 2011; Hurlimann *et al.*, 2014; Osman *et al.*, 2016). No presente estudo, a infecção mista mais frequente (9,33%) foi *B. hominis* e *G. duodenalis*. Alguns estudos têm descrito que o poliparasitismo, comparativamente com a infecção por uma única espécie de parasita, pode contribuir para uma maior morbidade e igualmente aumentar a suscetibilidade do hospedeiro a outras infecções, tais como a malária (Supali *et al.*, 2010; Lustigman *et al.*, 2012; Lobo *et al.*, 2014).

*Blastocystis hominis* é um protozoário cuja presença é amplamente variável no mundo tendo sido o parasita observado com maior frequência neste estudo. É reportado em diversos estudos epidemiológicos, podendo mesmo constituir o parasita mais prevalente, em determinadas regiões, principalmente em países de baixa e média renda (Dhurga, Suresh & Tan, 2016; Safadi *et al.*, 2016). Este protozoário infeta tanto os seres humanos como outros animais (Coyle *et al.*, 2012; Beyhan *et al.*, 2015). A prevalência atual de *B. hominis* descrita em crianças em idade pré-escolar e escolar é considerada elevada, mesmo tendo em conta que os métodos de deteção usados nesses estudos não sejam os mesmos: 100% no Senegal (Safadi *et al.*, 2014), 33% no Egito (Rayan, Ismail & Gayar, 2007), 28% na Síria (Al-kafri & Harba, 2009), 23% nos EUA (Amin, 2002) e 17% no Paquistão (Mehraj *et al.*, 2008). Diversos autores detetaram igualmente *B. hominis* como o parasita mais frequente nos seus estudos, realizados em crianças: Carrero (2013) na Colômbia, reportou uma percentagem de positividade de 88% para *B. hominis*; Santos *et al.*, (2014) e Leite, Toma & Adamil, (2014), no Brasil, obtiveram percentagens de 40,4% e 44%, respetivamente.

O segundo parasita observado com maior frequência neste trabalho foi *G. duodenalis*, à semelhança do que foi descrito no estudo realizado em Angola, por Oliveira *et al.*, (2015), em que foi registado um valor de 20,1%, em 328 crianças analisadas. *Giardia duodenalis* é um protozoário patogénico que ocorre com elevada prevalência no mundo, principalmente nos países com baixa renda, infetando nomeadamente crianças (Andrade *et al.*, 2010; Osman *et al.*, 2016). A giardíase em crianças pode causar severas repercussões negativas a nível do seu desenvolvimento físico e cognitivo, se não for diagnosticada atempadamente. A prevalência de infecção por *G. duodenalis* nas crianças em países africanos pode variar entre 1% a 36% e ocasionalmente pode atingir os 72% dependendo do grupo etário e do país (EPA, 1999; Ignatius, *et al.*, 2012; Ibarra *et al.*,

2016; Speich *et al.*, 2016). Por outro lado, a infecção por *G. duodenalis* pode encontrar-se sub-diagnosticada, principalmente nos países com baixa renda, onde a microscopia ótica é considerada a técnica de eleição para a detecção do parasita, atendendo os escassos recursos financeiros disponíveis. No presente trabalho, para além do diagnóstico parasitológico por microscopia ótica, todas as amostras foram sujeitas a diagnóstico molecular para *G. duodenalis*. A técnica de microscopia ótica é descrita na literatura, como sendo uma técnica, que apresenta menor sensibilidade comparativamente à *nested*-PCR. No entanto, dos 10,7% casos positivos para *G. duodenalis*, obtidos através de diagnóstico parasitológico, apenas 2,7% dos casos foram confirmados por *nested*-PCR. Tendo em conta que esta técnica apresenta elevada especificidade e sensibilidade, o insucesso observado na amplificação de DNA do parasita, por *nested*-PCR, poderá dever-se à presença de inibidores da Taq polimerase, frequentemente presentes, nas amostras fecais, tais como a bilirrubina, os sais biliares e polissacarídeos complexos, que por vezes não são removidos, pelos processos de extração de DNA (Gelanew *et al.*, 2007; Nantavisai *et al.*, 2007). A ausência de amplificação pode estar também associada a perda de material genético durante os processos de extração de DNA genómico nomeadamente, em amostras que já por si, apresentam uma baixa carga parasitária (Cook *et al.*, 2002; Nantavisai *et al.*, 2007) ou ainda devido a polimorfismos genéticos dos isolados obtidos que não permitam a sua correta amplificação pela técnica usada.

*E. histolytica/dispar* foi identificada por microscopia ótica neste estudo, em 2,7% das crianças estudadas. Tendo em conta o tamanho da nossa amostra, este resultado foi inferior à taxa de positividade (42,6%; 107/251) verificado no estudo realizado em crianças por Martins, Pires e Dias em Rincão-Santiago, e por Oliveira *et al.*, 2015, no sul de Angola (13,4%; 44/328). A prevalência de *E. histolytica* em todo o mundo permanece desconhecida, porque são poucos estudos a utilizar métodos moleculares, na detecção de *E. histolytica*, nomeadamente nos países com baixa renda. Este estudo destaca a importância da aplicação de técnicas que permitam a distinção de espécies no diagnóstico de *Entamoeba* (Oliveira *et al.*, 2015). Num estudo realizado na cidade de Gorgan, no norte do Irão, foram recolhidas 105 amostras de crianças hospitalizadas no Hospital de Taleghani e 25 foram positivas para *E. histolytica/dispar* em exame direto por microscopia. Porém, através de PCR, apenas duas amostras foram positivas para *E. histolytica* e três amostras para *E. dispar* (Sharbatkhori *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015).

No entanto, apenas *E. histolytica* é considerada uma espécie patogénica (Fotedar *et al.*, 2007; Ali, Clark, & Petri, 2008) o que reforça a necessidade de confirmar o resultado parasitológico, a fim de evitar tratamento desnecessário. Tendo em conta, a limitação da técnica de deteção por microscopia ótica aplicada no presente estudo, não foi possível fazer a distinção entre *E. histolytica* e *E. dispar* encontradas. A sua identificação específica só seria possível recorrendo a uma análise isoenzimática ou sero-imunológica, ou ao recurso a métodos moleculares, nomeadamente a técnica de PCR (Tanyuksel & Petri, 2003; Fotedar *et al.*, 2007; Ouattara *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Akhtar *et al.*, 2016; Plutzer & Karanis, 2016).

Neste trabalho, os protozoários não patogénicos nomeadamente *E. coli*, *E. hominis* e *I. butschlii*, foram identificados. Embora não sejam considerados agentes patogénicos, e sim, protozoários comensais, é importante salientar que podem auxiliar na determinação do grau de contaminação fecal, a que as crianças estão expostas e alertar para a possibilidade de transmissão de protozoários patogénicos cuja via (fecal-oral) de infeção é a mesma (Uchôa, *et al.*, 2009; Coradi, 2010; Lopes *et al.*, 2010; Borges, Marciano & Oliveira, 2011; Mathys *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo fornecem informações úteis para o delineamento de estratégias de prevenção e intervenções nas comunidades em risco.

No presente estudo, e uma vez que as metodologias microscópicas podem não ser suficientemente sensíveis na deteção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e esporos de *E. bieneusi*, todas as amostras fecais foram submetidas a análise molecular, por *nested*-PCR, tendo como alvo as regiões dos *loci*, SSU rRNA (*Cryptosporidium* spp) e ITS-rRNA (*E. bieneusi*). A aplicação de técnicas moleculares teve como principal objetivo a identificação de o maior número possível de amostras positivas, assim como a confirmação dos resultados obtidos através do diagnóstico parasitológico. Por outro lado, em Cabo Verde não existe informação molecular sobre a população de *Cryptosporidium* spp. e de *E. bieneusi* nos seres humanos. O presente trabalho, permitiu-nos obter informação relativamente à frequência da infeção por *Cryptosporidium* spp. e *E. bieneusi* nas crianças estudadas.

A frequência de infeção por *Cryptosporidium* spp. foi de 1,3%. Comparando as metodologias empregues neste estudo, de uma forma geral, o diagnóstico molecular

revelou ser a abordagem mais sensível. O método de detecção para a pesquisa de oocistos deste protozoário pode influenciar a frequência de infecção obtida no estudo, uma vez que os métodos moleculares apresentam uma maior sensibilidade e precisão do que os métodos microscópicos (Fayer *et al.*, 2000; Santín *et al.*, 2008). No nosso estudo, as frequências de infecção obtidas em cada uma das metodologias empregues vão ao encontro destas observações, uma vez que o número de amostras positivas obtidas pela técnica de *nested*-PCR, foi superior ao obtido pelo diagnóstico parasitológico. Nenhuma das amostras de fezes sugestivas de presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por exame direto, revelou-se positiva após coloração através da técnica de Ziehl-Neelsen modificada (referido no 2.6.2.3). Apesar da baixa frequência deste protozoário obtida no nosso trabalho, a criptosporidiose é endêmica nos países com baixa renda, infectando principalmente as crianças e os indivíduos imunocomprometidos (Osman *et al.*, 2016; Squire & Ryan, 2017).

No nosso estudo, a percentagem de *E. bienersi* observada foi de 5,3%. São diversos os estudos realizados, entre 2005 e 2014, em crianças onde identificaram a presença de *E. bienersi*, em amostras fecais: 6,6% no Uganda (Tumwine *et al.*, 2005), 5,2% Camarões (Sarfati *et al.*, 2006), 3,0% no Gabão (Breton *et al.*, 2007), 10,5% no Níger (Espern *et al.*, 2007), 1,7% na República Democrática do Congo (Wumba *et al.*, 2010), 9,3% na Nigéria (Ayinmode, Ojuromi & Xiao 2011) e 8,9%, em São Tomé e Príncipe (Lobo *et al.*, 2014). No nosso estudo o resultado observado já era, de algum modo esperado, dado que *E. bienersi* é considerado um microrganismo oportunista, que pode infectar principalmente crianças mais jovens e doentes, do que as crianças aparentemente saudáveis. *E. bienersi*, é o microsporídeo responsável por causar 90% de microsporidiose nos seres humanos (Lobo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016). No entanto, independentemente da metodologia utilizada no diagnóstico parasitológico, a microsporidiose por *E. bienersi* é muitas vezes subdiagnosticada, dadas as reduzidas dimensões dos seus esporos que possuem uma parede muito espessa (Didier *et al.*, 1995; Ashikin *et al.*, 2016). Por outro lado, os esporos apresentam uma estrutura morfológica semelhante a outros microrganismos (leveduras, bactérias) habitualmente existentes nas amostras de fezes, o que requer a presença de técnicos experientes para o diagnóstico correto deste microrganismo (Ashikin *et al.*, 2016). Também a presença de inibidores da PCR nas amostras biológicas pode influenciar o diagnóstico molecular diferencial. Neste trabalho, a identificação molecular de *E.*

*bieneusi* foi efetuada com base na amplificação da região polimórfica ITS rRNA, através de *nested-PCR*. Todavia, no diagnóstico de microsporidiose, e atendendo às dificuldades referidas anteriormente, é recomendado a utilização em simultâneo, de vários métodos de diagnóstico laboratorial, de modo a aumentar a sensibilidade do rastreio, o que não sucedeu neste estudo. Um dos métodos de referência descrito na literatura e que permite a caracterização específica do microsporídeo, é a utilização de microscopia eletrónica de transmissão. Todavia é uma metodologia onerosa, de procedimentos complexos e demorados, e de baixa sensibilidade. Não é usada no diagnóstico de rotina, encontrando-se limitada quase exclusivamente à investigação. A coloração histoquímica por Tricrómio Modificado é um dos métodos mais usuais empregues no diagnóstico de microsporídeos, em amostras biológicas. Esta técnica é pouco dispendiosa, não permite a identificação da espécie presente na amostra, mas requer pessoal muito experiente para a sua interpretação. A sua aplicação a este estudo poderia ter contribuído para a deteção de outros microsporídeos nas amostras fecais das crianças estudadas, nomeadamente *Encephalitozoon intestinalis*.

*Ascaris lumbricoides* com 4,7%, foi o helminta mais frequente identificado neste estudo. Resultados concordantes com esta predominância, sobre os outros helmintas detetados, foram reportados noutros estudos realizados em crianças, em países africanos embora registados numa maior percentagem de ocorrência: São Tomé e Príncipe (27,6% e 10,3%) e Angola (22%) (Lobo *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2015). Verificou-se uma baixa percentagem (3,3%), de infeção por *H. nana*. À semelhança do nosso trabalho, no estudo realizado em Angola por Mirante *et al.*, (2016), também encontraram uma maior frequência de crianças infetadas por *A. lumbricoides* (11,3%). Sendo que para *H. nana* foi registado um valor de 6,3%, em 200 crianças analisadas. O predomínio de *A. lumbricoides* sobre este outro helminta observado no presente estudo poderá estar associada quer ao grande número de ovos produzidos pelas fêmeas de *A. lumbricoides*, quer pelo facto dos seus ovos permanecerem no ambiente durante vários anos (Oliveira *et al.*, 2015). Sugere-se que a ausência de infeção por outros helmintas, nomeadamente outros geohelmintas habitualmente encontrados nos estudos em países de baixa renda e clima tropical, possa estar associada ao clima árido característico de Cabo Verde.

### **Infeção parasitária e fatores sociodemográficos**

A infeção humana por parasitas intestinais, tem sido associada a determinados fatores de risco dos quais se destacam, a idade e o género do hospedeiro, o destino de esgoto na habitação, assim como o tipo de abastecimento de água disponível para consumo. Este último de grande impacto, uma vez que, a água é considerada um importante veículo de transmissão de enteroparasitoses (Costamagna *et al.*, 2005; Baldursson, & Karanis, 2011; Carrero, 2013; Boisson *et al.*, 2015; Chin *et al.*, 2016). No presente estudo foram investigadas possíveis associações entre estes e outros fatores sociodemográficos e clínicos e a presença dos microrganismos estudados nas amostras fecais das crianças.

Relativamente ao género das crianças estudadas, não foi encontrada uma associação estatisticamente significativa no que diz respeito à presença de infeção parasitária, o que vai ao encontro de estudos descritos anteriormente, por outros autores (Gurgel *et al.*, 2005; Outtara *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2015). No entanto, pertencer ao sexo masculino tem sido identificado como fator de risco, em certas comunidades em que a cultura confina ao sexo feminino tarefas domésticas e a permanência em casa, em detrimento da exposição do sexo masculino aos fatores ambientais (Shaikh, Begum & Hussain, 2009). Esta realidade não é comum em Cabo Verde (Ilha de Santiago), onde as mulheres têm um papel ativo nas várias vertentes da sociedade e onde existe uma preocupação governamental para com a igualdade de género (Culture Grams<sup>TM</sup>, 2003). Quanto à idade, no presente estudo, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a presença de infeção parasitária nas crianças e o grupo etário estudado, em que a maior frequência de parasitas intestinais foi verificada na faixa etária dos 0-3 anos (39,6%). Este facto foi corroborado por estudos realizados anteriormente no Brasil, por Nascimento *et al.*, (2009) e por Lopes *et al.*, (2010) onde obtiveram uma maior frequência de parasitoses intestinais em crianças que pertenciam à faixa etária dos 0-3 anos. Esta percentagem elevada observada no nosso estudo, também pode ser justificada pelo facto de que crianças compreendidas nesta faixa etária, já têm alguma autonomia, e consequentemente estão expostas a um maior contacto com o solo e com outras crianças, e para além disso, desconhecendo os princípios básicos de higiene, encontrando-se mais suscetíveis à infeção por parasitas intestinais (Harpham & Stephens 1991; Machado & Costa-Cruz, 2008; Lopes *et al.*, 2010). Sugere-se que, a presença de um sistema imunitário bastante imaturo, nestas crianças tão jovens, relativamente às das faixas etárias superiores,



aumenta o risco de contraírem não só um maior número de infecções, incluindo as parasitárias, como desenvolver patologia mais severa (Lopes *et al.*, 2010). No estudo realizado em Kenitra (Marrocos) por Elqaj *et al.*, (2009) reportaram que quanto menor é a idade da criança, maior é o risco de infecção por parasitas intestinais.

Quanto ao grau de escolaridade dos encarregados de educação verificou-se uma maior percentagem (50,5%) de crianças parasitadas com encarregados de educação que frequentaram o ensino secundário. Contudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a presença de infecção parasitária e o grau de escolaridade dos encarregados de educação, contrariamente ao referido por outros autores, que relacionam o baixo nível educacional dos cuidadores das crianças com o risco de infecção por parasitoses intestinais (Naish, McCarthy & Williams, 2004; Okyay *et al.*, 2004; Dumba, Kaddu & Mangen, 2008).

A elevada prevalência de parasitoses intestinais também tem sido associada com o tipo da habitação (Dumba, Kaddu & Mangen, 2008). Em Cabo Verde, as condições habitacionais têm melhorado nos últimos anos, uma vez que o governo do país, juntamente com o governo português construíram habitações a partir do Programa Casa Para Todos, com o objetivo de diminuir o défice habitacional no país assim como o número de casas clandestinas (Govcv, 2017). No nosso estudo não se verificou diferença estatisticamente significativa entre o tipo de casa e a presença de infecção parasitária. No entanto, constatou-se que a maioria das crianças estudadas (83,3%) residiam em casas térreas, e que entre as que possuíam este tipo de habitação, 80,2% encontravam-se parasitadas. Esta elevada prevalência de parasitoses em crianças que vivem em casas térreas pode estar associada a um maior contato com solo e/ou outras potenciais fontes de infecção em redor da habitação, do que as crianças que residem nos apartamentos. Assim, estas últimas encontram-se menos expostas a parasitas intestinais diminuindo o risco de contraírem infecção (Dumba, Kaddu & Mangen, 2008).

Por outro lado, sabe-se que a elevada prevalência de parasitoses intestinais, tem origem tanto em transmissão de pessoa-a-pessoa, como em ingestão de água e alimentos contaminados com o parasita, associadas a carências nas infraestruturas de saneamento básico (e.g rede de esgoto e canalizações de água) (Verweij, *et al.*, 2004; Franco, 2007), e ainda pode ocorrer através do contato com animais infetados. (Nuñez *et al.*, 2003; Heller

*et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Costamagna *et al.*, 2005). No presente estudo, 70,7% das crianças residiam em casas cujo abastecimento de água era proveniente da rede pública e 42% em que era proveniente de poço. Com base nestes dados, parte-se de princípio que a água que chega, na grande maioria das residências das crianças passa por um tratamento prévio, que inclui filtração e cloração, procedimentos estes adequados à produção de uma água potável para o consumo público. Em Cabo Verde, segundo o Ministério da Saúde, apenas 15% dos encarregados de educação realizavam o procedimento de desinfecção da água de consumo com lixívia. Contudo, um estudo realizado por Vieira, Fernandes, Antunes, & Pina, (2010), demonstrou que parte da água para o consumo humano distribuída na rede pública da Cidade da Praia não tem a qualidade mínima aceitável para o consumo. Este fato, pode estar relacionado com a elevada prevalência de parasitoses intestinais no geral, nas crianças, e em particular a infecção por protozoários, e pode justificar os resultados obtidos no nosso estudo. Por outro lado, os protozoários, nomeadamente os protozoários patogénicos permanecem uma preocupação constante para os sistemas produtores de água e indústria de alimentos. Dado a isto, o Ministério da Saúde recomenda a monitorização da ocorrência dos protozoários na água tratada, com o objetivo de obter água potável para o consumo. No entanto, vários fatores podem dificultar o cumprimento desta recomendação, como os altos custos das metodologias validadas, a complexidade laboratorial inerente ao método, a necessidade de pessoal devidamente treinado e a falta de informações disponíveis sobre a ocorrência destes parasitas nas nascentes/fontes nacionais. Neste trabalho, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os tipos de abastecimento de água e as crianças que se encontravam com infecção parasitária, sendo que 75,7% das crianças parasitadas tinham água canalizada. Por outro lado, uma menor percentagem de crianças com infecção parasitária no geral (35,1%) e infecção apenas por protozoários, (35,8%), referiram ter poço como tipo de abastecimento de água. Apesar da maioria de crianças parasitadas neste estudo ter referido não ter poço como abastecimento de água, e, portanto, neste caso, o fator consumir água de poço, parecer não constituir um risco de infecção parasitária, sabe-se que em grande parte dos casos a água proveniente destas estruturas é frequentemente contaminada, por exemplo, por esgotos a céu aberto. Este fato não é invulgar verificar-se em Cabo Verde, sendo assim possível que o consumo de água de poço, nalgumas das habitações das crianças estudadas, possa estar relacionado com a

frequência das enteroparasitoses encontrada. Contrariamente ao estudo realizado em São Paulo, por Katagiri e Sequeira (2007), que reportaram a presença de animais de companhia nas habitações como fator de risco associado à infecção por parasitas intestinais, no nosso estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de animais domésticos e a presença de infecção parasitária. No entanto, a maior percentagem de crianças parasitadas (85,2%) foi observada nas habitações onde existia cão e/ou gato.

A ausência ou presença de infraestruturas de saneamento básico precárias, em determinadas regiões, nomeadamente no respeitante ao destino de esgoto, é um fator importante na disseminação das parasitoses intestinais (Ludwig *et al.*, 1991; Gurgel *et al.*, 2005; Barreto, 2010; Speich *et al.*, 2016). No nosso trabalho, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao destino do esgoto na habitação, referidos pelos encarregados de educação e à presença de infecção parasitária nas crianças. Observou-se que a maior percentagem (50,5%) de crianças com infecção parasitária tinham como destino de esgoto nas suas habitações, a rede de esgoto. Entre as crianças, cujos encarregados de educação referiram que os resíduos eram eliminados na natureza (a céu aberto), uma minoria encontrava-se parasitada (13,5%) e entre as que na sua habitação referiram a existência de fossa, como destino de esgoto, também apenas uma minoria se verificou infecção parasitária (35,1%). No entanto, estes resultados salientam a necessidade de implementar e melhorar as infraestruturas existentes de saneamento básico, alargando a rede de esgoto a mais regiões à população, melhorando assim, também, o próprio ambiente. Para além do saneamento básico, no que diz respeito ao destino de esgoto, existe outros fatores (hábitos de defecação e higiene das mãos) que com frequência são associados à infecção de crianças, por parasitas intestinais, tendo sido descrito em diversos estudos (Khan, 1979; Naish, McCarthy & Williams, 2004; Dongre *et al.*, 2008; Alum, Rubino & Ijaz, 2010; Ahmed *et al.*, 2017). Nos estudos realizados por Naish, McCarthy & Williams (2004) no sul da Índia, e por Ahmed *et al.*, (2017), na Eritreia encontraram uma associação significativa entre presença de infecção parasitária com os hábitos de defecação e a presença de unhas sujas. No entanto nestes estudos, a maioria das crianças tinham o hábito de defecar ao redor das habitações e/ou nos campos. No nosso trabalho, foi evidente, à semelhança dos estudos realizados por Naish, McCarthy & Williams (2004) e por Ahmed *et al.*, (2017) o impacto que os hábitos de

defecação têm na prevalência das parasitoses intestinais, uma vez que as diferenças entre as percentagens de crianças parasitadas e os hábitos de defecação foram significativas. Contudo, no nosso estudo a maioria das crianças parasitadas tinham o hábito de defecar na casa de banho. Este resultado sugere que a maioria destas crianças parasitadas, provavelmente não usaria a sanita, mas sim o bacio, o que implica uma necessidade posterior de uma manipulação dos recipientes contendo as fezes e potencia a exposição quer das crianças quer dos cuidadores a uma possível infeção. Todavia, as crianças também podem igualmente, infetar-se a partir da partilha de casa de banho, sem a higiene adequada. Atende-se que, que o nosso estudo é constituído por um grande número de crianças muito jovens, nomeadamente numa faixa etária, em que as crianças têm tendência a brincar nas próprias fezes. No que diz respeito à higiene das mãos após ir à casa de banho, não foi encontrado uma associação significativa com a presença de infeção parasitária. Porém, 73,9% das crianças que lavavam as mãos, se encontravam parasitadas. Esta percentagem elevada observada no nosso estudo, pode ser justificada pelo facto de que as práticas de higiene das mãos efetuadas pelas crianças eram precárias. Ainda no âmbito do saneamento básico, relativamente à recolha urbana dos resíduos sólidos não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infeção parasitária e a recolha do lixo, embora 97,3% das crianças, em que os encarregados de educação utilizavam os contentores, com serviço de recolha de lixo municipalizado, estavam parasitadas. Refira-se que, na quase totalidade das habitações das crianças deste estudo, apenas em 3,3% não se efetuava a recolha de lixo.

De modo a investigar possíveis associações entre os diversos fatores sociodemográficos analisados e as crianças com infeção parasitária foram também divididas em apenas dois grupos um incluindo crianças com infeção por protozoários (*E. bieneusi* foi incluído neste grupo, como já foi referido anteriormente) e o outro com crianças infetadas por helmintas intestinais. Assim, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infeção por protozoários intestinais nas crianças estudadas e a faixa etária (a maioria entre os 0-3 anos), com o hábito de defecação (a maioria referiu defecar na casa de banho), e com o tipo de abastecimento de água (a maioria reportou não consumir água de poço). Apesar de, uma menor percentagem de crianças com infeção por protozoários, ter referido o poço como tipo de abastecimento de água, o valor observado de 35,8%, ainda é de salientar. No estudo realizado numa creche no Brasil, por Komagome *et al.*,

(2007) obtiveram igualmente uma associação significativa entre a presença de infecção por protozoários e o tipo de abastecimento de água através do poço. Entretanto resultados obtidos em outros estudos mostraram que as crianças em idade pré-escolar e escolar em regiões menos favorecidas são mais suscetíveis às infecções por protozoários intestinais uma vez que nestas regiões as condições socioeconómicas são baixas e o acesso a água potável é escasso (Prado *et al.*, 2001; Silva & Santos 2001; Speich *et al.*, 2016). Por outro lado, os quistos dos protozoários são resistentes aos produtos químicos usados no tratamento da água de consumo, o que pode estar relacionado com uma maior frequência de crianças infetadas por protozoários (Franco, 2007; Speich *et al.*, 2016). Quanto aos hábitos de defecação, à semelhança do estudo realizado na indonésia, por Yulfi *et al.*, (2016), no nosso estudo foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção por protozoários e os hábitos de defecação. No entanto, no estudo realizado por Yulfi *et al.*, (2016) a maior percentagem de infecção por protozoários foi observada nos indivíduos que defecavam no campo ou em latrinas inadequadas, o que pode aumentar o risco de exposição a protozoários (por exemplo, os quistos/oocistos/espores podem ser transferidos para água e alimentos através do vento e por vetores mecânicos). No entanto, no presente estudo, sugerem-se idênticas hipóteses às referidas no parágrafo anterior, relativamente à associação significativa entre a infecção parasitária nas crianças e o hábito de defecar na casa de banho. No que diz respeito à presença de infecção por protozoários intestinais não patogénicos, verificou-se no nosso estudo, uma associação estatisticamente significativa com o grupo etário estudado, sendo que a maior percentagem de crianças infetadas por protozoários intestinais não patogénicos (71,4%) foi observada na faixa etária dos 7-10 anos. Este facto foi corroborado por Lopes *et al.*, (2010), num estudo realizado no Brasil em que verificaram uma maior frequência de crianças infetadas por protozoários intestinais não patogénicos (27,3%; 18/66) na faixa etária dos 7-9 anos. Sugere-se que ambos os resultados possam estar associados ao fato de que crianças numa faixa etária superior, terem maior autonomia, maior contato com o solo, e consequentemente podem estar mais expostas a parasitas, inclusive a uma maior diversidade de espécies.

A elevada frequência de *B. hominis* tem sido associada a condições de higiene precárias, à ingestão de água e alimentos contaminados com o parasita e o contato com animais infetados (Puthia *et al.*, 2006; Beyhan *et al.*, 2015; Safadi *et al.*, 2016; Salvador *et al.*,

2016). Neste trabalho, constatou-se que 84,0% das crianças parasitadas tinham cão e/ou gato. Contudo, não se observou qualquer relação entre a presença de animais domésticos nas habitações das crianças estudadas e a infecção por *B. hominis*. Quanto ao tipo de abastecimento de água, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a presença do parasita nas crianças e a ausência de consumo de água de poço. Apenas numa minoria de 36,5% das crianças parasitadas por *B. hominis* tinham poço como abastecimento de água. No entanto, estes resultados sugerem que a água possa constituir um reservatório primário de transmissão do microrganismo. No entanto, estudos futuros que incluam a análise de amostras de água e de alimentos, são necessários, dado que podem auxiliar na identificação de potenciais reservatórios primários de transmissão (Safadi *et al.*, 2016).

*Giardia duodenalis* é considerado o protozoário como causa mais comum de surtos epidémicos de doenças transmitidas através da água de consumo (Franco, 2007; Baldursson & Karanis, 2011; Yoder *et al.*, 2012; Osman *et al.*, 2016). Os seus quistos são resistentes ao cloro utilizado no tratamento da água (Borges, Marciano & Oliveira, 2011; Neves *et al.*, 2011; Halliez & Buret, 2015; Ghenghesh *et al.*, 2016). Contudo, no nosso estudo, apesar das diferenças não terem sido estatisticamente significativas entre a presença de infecção por *G. duodenalis* e o tipo de abastecimento de água, a maior frequência de crianças parasitadas (62,5%) foi observada nas crianças que tinham água canalizada como tipo de abastecimento. Mais uma vez, este resultado pode estar associado, às canalizações antigas existentes em Cabo Verde ou a um tratamento ineficaz da água, uma vez que os quistos de *G. duodenalis* são resistentes a maioria dos produtos químicos utilizados no tratamento da água de consumo. Um outro fator de risco que tem sido associado à infecção por *G. duodenalis* é a presença de animais domésticos, nomeadamente gatos e cães (Thompson, 2000; García, Campos, Cardoso, 2005; Tashima *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2014). À semelhança do estudo realizado por Osman *et al.*, (2016) em crianças no Líbano, no nosso trabalho, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de animais domésticos e infecção por *G. duodenalis*. No entanto, 50,0% das crianças parasitadas por *G. duodenalis* tinham animais domésticos, sendo que a maioria (87,5%) tinham cão e/ou gato. Deste modo, seria interessante, para confirmar a hipótese de o animal doméstico ser a fonte de contaminação

das crianças, proceder ao exame parasitológico das fezes dos animais de estimação referidos.

Relativamente à ocorrência de criptosporidiose e microsporidiose, existe um interesse e uma preocupação muito particulares relativamente à ocorrência destas infeções nas crianças, uma vez que apresentam um sistema imunitário imaturo (Nascimento *et al.*, 2009). Em Angola, no Hospital General do Bengo, a percentagem de infeção por *Cryptosporidium* spp. em crianças até 12 anos de idade com e sem diarreia foi de 30,0%, verificando-se uma associação estatisticamente significativa com a idade, sendo que a maior prevalência foi sobretudo em crianças com idades compreendidas entre 0-12 meses (21,8%) (Gasparinho *et al.*, 2016; Squire & Ryan, 2017). Em São Tomé e Príncipe, no Hospital Aires de Menezes, a prevalência de criptosporidiose em crianças até 10 anos de idade com e sem diarreia foi de 8,9% e não se verificou uma associação significativa entre a presença de *Cryptosporidium* spp. e a idade das crianças (Lobo *et al.*, 2014; Squire & Ryan, 2017). No nosso estudo, as diferenças entre a presença de infeção por *Cryptosporidium* spp. e o grupo etário estudado não foram significativas. Contudo, a presença de 1,3% de crianças infetadas por *Cryptosporidium* spp. confirma que nesta região, ocorre a transmissão de criptosporídeos, o que pode trazer implicações graves ao nível da saúde pública, uma vez que as crianças infetadas são importantes fontes de infeção e, eventualmente, responsáveis pela perpetuação da infeção na comunidade. Para além disso, nas crianças, cujo sistema imunitário ainda não está completamente desenvolvido, a infeção pode originar problemas no desenvolvimento físico e cognitivo e, conseqüente retardamento do crescimento (Squire & Ryan, 2017). Na literatura o microsporídeo *E. bieneusi*, é frequentemente associado à população de crianças de baixas faixas etárias, nomeadamente em crianças com idade pré-escolar e escolar. No presente trabalho, embora a maior percentagem de crianças infetadas (50,0%) por *E. bieneusi* estivessem incluídas na faixa etária dos 4 aos 6 anos, não foi registada associação estatisticamente significativa entre o grupo etário das crianças estudadas e a infeção por *E. bieneusi*, à semelhança do estudo realizado por Lobo *et al.*, (2014) no Hospital Aires Menezes, em São Tomé e Príncipe. Igualmente, não foram encontradas relações entre os outros fatores sociodemográficos avaliados e a presença de *E. bieneusi* nas amostras fecais.

### **Infeção parasitária e fatores clínicos**

Do ponto de vista clínico, as protozooses e as helmintíases são doenças de manifestação espectral, variando desde casos assintomáticos a casos graves. Nos casos sintomáticos, os sintomas registados são normalmente dor abdominal, diarreia, febre, irritabilidade, dor de cabeça, náuseas, vômitos e anorexia (Melo *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2010). Os quadros clínicos mais graves podem ocorrer nos doentes com elevada carga parasitária e em imunossuprimidos. Contudo neste estudo, não se verificou diferenças estatisticamente significativas entre a presença de imunossupressão e a presença de infeção parasitária. No entanto, a baixa percentagem de crianças estudadas com imunossupressão pode ter condicionado esta avaliação. No presente estudo, do total de crianças (70,0%) que apresentavam sintomas, 71,2% estavam parasitadas, sendo que a maior percentagem (55,0%) de infeção parasitária foi observada nas crianças que apresentavam dores abdominais como sintomatologia. Não foi encontrado uma associação estatisticamente significativa entre a presença de sintomatologia e a presença de infeção parasitária, à semelhança dos resultados apresentados por Santos *et al.*, (2008) em crianças no Brasil, e por Lobo *et al.*, (2014), em crianças de São Tomé e Príncipe. No entanto, no nosso estudo, contrariamente ao estudo realizado em crianças na Nigéria por Houmsou, Amuta & Olusi (2009), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a presença de dor de cabeça e as crianças com e sem infeção parasitária.

Diversos estudos registaram um decréscimo das parasitoses intestinais após campanhas de desparasitação, nomeadamente no Laos (Phommasack *et al.*, 2008) e no Camboja (Chesnaye *et al.*, 2011), ambos realizados em crianças em idade escolar, e na Argentina (Pezzani *et al.*, 2009), na população geral de uma comunidade rural. No nosso estudo, não foi encontrada associação significativa entre a presença de infeção parasitária nas crianças e o tratamento antiparasitário, realizado no ano que precedeu o estudo. No entanto, verificou-se uma maior percentagem de infeção parasitária (55,9%) no grupo de crianças não submetidas a desparasitação, relativamente às crianças em que foi administrado o antiparasitário. Este resultado pode resultar do facto de em Cabo Verde as campanhas de desparasitação profilática incluírem apenas fármacos anti-helmínticos que visam principalmente o tratamento da infeção por helmintas, e apresentam pouca ou nenhuma eficácia terapêutica nas infeções por protozoários intestinais. Refira-se ainda,



que neste trabalho verificou-se um predomínio de crianças parasitadas por protozoários intestinais, em que 56,0% não se encontravam desparasitadas.

No que diz respeito aos protozoários intestinais não patogênicos identificados, neste estudo (*E. coli*, *E. hominis*, *I. bütschlii*), levantou-se a hipótese de os sintomas apresentados pelas crianças estarem relacionados com a sua ocorrência causando alteração da flora intestinal, das crianças parasitadas. No presente estudo, verificou-se que todas as crianças que se encontravam parasitadas por protozoários não patogênicos (4,7%) eram sintomáticas, em que dor de cabeça foi o sintoma descrito com maior frequência. As diferenças entre as crianças parasitadas e não parasitadas por protozoários intestinais não patogênicos e a presença de dor de cabeça foram estatisticamente significativas, contudo, a maioria dessas crianças, para além de estarem infetadas por protozoários não patogênicos apresentavam coinfeção com outros parasitas, fato este que não nos permite retirar conclusões quanto à origem dos sintomas descritos.

De acordo com a literatura, a patogenicidade de *B. hominis* ainda é considerada controversa. No entanto, alguns autores têm associado este protozoário a sintomatologia, por vezes grave, nomeadamente em indivíduos imunossuprimidos (Carrascosa, Martínez & Pérez-Castrillón, 1996; Andiran *et al.*, 2006; Safadi *et al.*, 2016; Salvador *et al.*, 2016). Para esclarecer a relevância clínica de *B. hominis* foram publicados alguns estudos epidemiológicos comparando a prevalência entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos (Tan, 2008; Clark *et al.*, 2013; Wawrzyniak *et al.*, 2013; Safadi *et al.*, 2016). Contrariamente ao observado nestes estudos, no nosso trabalho, tendo em conta apenas as crianças 43,3% que se encontravam parasitadas por *B. hominis*, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as crianças sintomáticas, assintomáticas e imunossuprimidas. Contudo, do total de crianças infetadas apenas por *B. hominis* 70,8% eram sintomáticas. No nosso estudo, dentro do grupo sintomático, à semelhança de estudos previamente descritos por Tan, (2008) nos EUA, Osman *et al.*, (2016) no Líbano, Safadi *et al.*, (2016) em França e por Salvador *et al.*, (2016) em Espanha, a dor abdominal foi reportada como o sintoma mais frequente. Sendo que no nosso estudo 55,4% de crianças que apresentavam dor abdominal encontravam-se infetadas. Contudo, apesar de não de ter sido observada associação entre a ocorrência de *B. hominis* e a presença de dor abdominal, nestas crianças não foi detetado nenhum dos

outros parasitas em estudo, podendo-se especular a possibilidade desta sintomatologia ser causada pela infecção por *B. hominis* (Salvador *et al.*, 2016).

*Giardia duodenalis* tem sido considerada como uma das causas mais comuns de diarreia (Baldursson & Karanis, 2011; Yoder *et al.*, 2012; Osman *et al.*, 2016). Neste estudo, 31,2% das crianças parasitadas por *G. duodenalis* apresentavam diarreia. No entanto, a maior frequência de crianças parasitadas por *G. duodenalis* (62,5%) foi observada nas crianças que apresentavam dor abdominal como sintomatologia. Contudo, contrariamente aos estudos realizados em crianças, por Osman *et al.*, (2016) e por Liao *et al.*, (2017), no Líbano e no Camboja, respetivamente, não foi encontrada associação significativa entre a ocorrência de dor abdominal e diarreia e a presença de infecção por *G. duodenalis*.

*E. histolytica* é considerado um agente etiológico causador de diarreia, principalmente nas crianças. No nosso estudo, embora as crianças infetadas por *E. histolytica/dispar* apresentarem sintomas clínicos como diarreia e dor abdominal, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, à semelhança do estudo realizado em crianças hospitalizadas, no norte do Irão, por Sharbatkhori *et al.*, (2014).

A presença de diarreia faz também parte da sintomatologia tipicamente associada à infecção por *Cryptosporidium* spp. e por *E. bieneusi*, particularmente nos indivíduos imunossuprimidos (Abreu-Acosta *et al.*, 2005; Satheeshkumar *et al.*, 2005; Endeshaw *et al.*, 2006; Osman *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2016; Wei Li *et al.*, 2016). No presente estudo, nenhuma das crianças infetadas por *Cryptosporidium* spp. encontravam-se imunossuprimidas, nem apresentavam diarreia, contrariamente ao reportado no estudo realizado em crianças no Líbano, por Osman *et al.*, (2016) em que verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a presença de infecção por *Cryptosporidium* spp. e a presença de diarreia. Relativamente à frequência de crianças positivas para *E. bieneusi*, 25,0% apresentavam diarreia. Contudo, não foi observada uma associação significativa entre a presença de diarreia e a percentagem de crianças com microsporídeos nas fezes. Este facto foi corroborado por Lobo *et al.*, (2014) num estudo realizado em crianças hospitalizadas em São Tomé e Príncipe.

A diarreia é uma das principais causas de morte infantil, estimando-se que os rv sejam responsáveis por um terço das hospitalizações por gastroenterite aguda em crianças com menos de 5 anos de idade (Tate *et al.*, 2012). Neste estudo, encontramos uma frequência

de infecção por RV de 6% entre as crianças. Esta percentagem é muito inferior ao valor estimado pela OMS a nível global (36%) em crianças hospitalizadas devido a diarreia (Glass *et al.*, 2014) e inferior à prevalência descrita para África (29%-52%) (Mwenda *et al.*, 2010). Do total das amostras analisadas, observou-se que 2,7% das amostras positivas eram provenientes de crianças com idade compreendida na faixa etária dos 0-3 anos, confirmando a incidência de infecção por RV durante os dois primeiros anos de vida (Mwenda *et al.*, 2010; Odiit *et al.*, 2014; Abebe *et al.*, 2014). Os nossos resultados à semelhança de outros estudos, demonstram que a infecção é mais frequente em crianças mais novas em comparação com crianças mais velhas (Peter *et al.*, 2009; Mwenda *et al.*, 2010; Gasparinho *et al.*, 2016). No entanto, não se verificou uma associação significativa entre o grupo etário das crianças e a infecção por RV. Comparativamente com os casos de gastroenterite causados por outros agentes etiológicos, na gastroenterite por RV observa-se uma maior frequência de crianças com vômitos e diarreia. Contudo, no nosso estudo não se verificou uma associação significativa entre estas manifestações clínicas e a infecção por rotavírus, contrariamente a outros estudos (Parashar *et al.*, 2006; Abebe *et al.*, 2014). A título de exemplo, num estudo desenvolvido no Zimbabué observou-se também uma maior percentagem de crianças com vômitos infetadas por RV em comparação com crianças não infetadas (77% vs. 57%) (Mukaratirwa *et al.*, 2014).

### 4.2. Conclusões

As parasitoses intestinais representam um problema de saúde pública e encontram-se entre as doenças parasitárias mais prevalentes no mundo (Rop *et al.*, 2016). São responsáveis por elevados índices de morbilidade, principalmente nos países de baixa renda onde o crescimento populacional não é acompanhado da melhoria nas condições de vida (Ferreira *et al.*, 2000; Kiani *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2016). Vários são os programas estabelecidos por Organizações Governamentais e Não Governamentais para o controlo das parasitoses intestinais. No entanto, é preciso caracterizar cada comunidade para que as diretrizes estabelecidas não sejam um fracasso, quando implementadas de forma descontextualizada.

Durante o presente trabalho foi possível avaliar a ocorrência de uma elevada percentagem de infecção por parasitas intestinais, incluindo protozoários, helmintas e uma espécie de microsporídeo nas crianças dos 0-10 anos estudadas. A utilização regular de fármacos

antiparasitários, como medida profilática, entre a população de crianças, em Cabo Verde pode ter influenciado os resultados encontrados, nomeadamente a baixa ocorrência de helmintas intestinais. Tendo em conta a elevada percentagem de protozoários encontrada nesta população de crianças, recomenda-se que sejam implementadas programas educacionais e medidas efetivas na sua prevenção e consequentemente, devem ser feitos esforços para compreender melhor as consequências da coexistência de parasitas intestinais (inclusive parasitas comensais) no mesmo hospedeiro, nomeadamente no que diz respeito às respostas imunitárias e, mais importante, se tais interações entre diferentes espécies aumentem a suscetibilidade do hospedeiro a outros agentes patogénicos. A presença de protozoários comensais encontrada, indica que ocorreu contaminação fecal oral, o que os torna propícios a adquirir parasitas patogénicos, pois estes possuem a mesma via de transmissão que os comensais.

A análise molecular das amostras de fezes, permitiu identificar a presença de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., e de *E. bienewisi* neste estudo. Estes resultados indicam que a infeção por estes parasitas é relativamente frequente em crianças. Embora, não tenham sido encontradas associações significativas, entre os fatores clínicos avaliados, são vários os estudos que consideram *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. bienewisi* importantes agentes etiológicos de diarreia e de gastroenterite aguda em crianças, que podem originar um défice no crescimento físico e cognitivo, particularmente em crianças muito jovens. A presença destes parasitas patogénicos para o Homem, sugere que desempenhem um papel relevante a nível da Saúde Pública, salientando a importância da implementação da pesquisa destes agentes etiológicos no diagnóstico de rotina, uma vez que os clínicos no HAN não consideram este diagnóstico em doentes imunocompetentes, particularmente em crianças com diarreia e consequentemente não solicitam exames de fezes para *Cryptosporidium* spp. e para *E. bienewisi*. Deste modo, sugere-se a implementação dos métodos moleculares nos laboratórios de patologia clínica em Cabo Verde, principalmente no laboratório do HAN. Os resultados de estudos epidemiológicos moleculares permitem-nos responder a algumas perguntas epidemiológicas que são difíceis de abordar por métodos tradicionais, nomeadamente frequência de infeções mistas, ocorrência de surtos e de doenças através da transmissão zoonótica. Por outro lado, estes estudos possibilitam uma melhor compreensão da epidemiologia das protozooses nos seres humanos. Contudo, o caminho a percorrer é longo e repleto de

especificidades para que o objetivo do controlo das parasitoses intestinais na Cidade da Praia (Cabo Verde) seja alcançado.

Face à prevalência da infeção por RV no HAN, pode-se concluir que é importante fazer mais estudos para detetar RV com o objetivo de avaliar os possíveis fatores de risco de gastroenterite grave nas crianças e também para fazer a monitorização contínua das estirpes virais circulantes na Cidade da Praia, a partir de métodos moleculares. Só assim será possível avaliar a necessidade de implementação da vacina em Cabo Verde.

Para concluir e como intervenções gerais para o controlo das parasitoses recomenda-se: a formação, a educação para a saúde, a desparasitação regular, o diagnóstico e o tratamento precoce, a melhoria do saneamento e da higiene.

Ao HAN sugere-se:

- ❖ Formação aos técnicos de laboratório, sobre técnicas de rotina para o diagnóstico das parasitoses intestinais.
- ❖ Investimento em novas técnicas de diagnóstico de parasitoses intestinais.
- ❖ Estudo epidemiológico molecular das espécies de protozoários intestinais, nomeadamente, *E. histolytica*, *E. dispar*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp.* e microsporídeos (*E. bienersi*).
- ❖ Palestras de educação para a saúde às crianças e aos encarregados de educação sobre as parasitoses intestinais. A implementação de programas de educação em saúde é de grande importância, visto que através delas pode-se interferir no mecanismo de transmissão de diversas doenças que atingem a população. Por outro lado, estas ações educativas para a promoção da saúde devem ser contínuas, pois transformam as crianças em disseminadores do conhecimento para as suas famílias e comunidades, atuando de forma ativa na melhoria do meio em que vivem.

Às Autarquias sugere-se:

- ❖ Disseminação da rede de esgotos, abastecimento de água tratada, recolha e tratamento de resíduos, a fim de melhorar as condições de vida dessas crianças. A água é fornecida pelas autoridades competentes, entretanto, a carência de água tratada e de rede de esgoto em algumas localidades da Cidade da Praia, contribui para a disseminação das parasitoses intestinais na população.

- ❖ Avaliação sistemática dos riscos ao longo de todo o sistema de abastecimento de água, tanto da água da rede pública como da água subterrânea (poços), afim de certificar-se da ausência de agentes patogénicos e para que se possa delinear uma estratégia para o controlo dos fatores de risco.

### **4.3. Considerações finais e perspectivas futuras:**

Apesar da clara importância da transmissão antroponótica e hídrica das parasitoses intestinais, nomeadamente de *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. bienersi*, importa salientar que estudos adicionais, incluindo a análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), genotipagem, caracterização molecular, análise de amostras biológicas de animais e ambientais e um maior número de amostras de crianças são necessários.

No presente estudo, devido às técnicas laboratoriais utilizadas não nos foi possível fazer a distinção entre *E. histolytica* e *E. dispar*, por isso sugere-se estudos futuros utilizando métodos moleculares, nomeadamente PCR com o objetivo de diferenciar essas duas espécies.

## 5. Referências Bibliográficas

- Abebe, A., Teka, T., Kassa, T., Seheri, M., Beyene, B., Teshome, B., Kebede, F., Habtamu, A., Maake, L., Kassahun, A., Getahun, M., Mitiku, K & Mwenda, J.M. 2014. Hospital-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in children younger than 5 years of age in Ethiopia: 2007-2012. *Pediatr Infect Dis J.*, 33, S28-33.
- Abreu-Acosta, N., Lorenzo-Morales, J., Leal-Guio, Y., Coronado-Alvarez, N., Foronda, P., Coba-Florez, J., Izquierdo, F., Batista-Diaz, N., del, A. C. & Valladares, B. 2005. *Enterocytozoon bieneusi* (microsporidia) in clinical samples from immunocompetent individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Trans.R. Soc.Trop. Med.Hyg.*, 99, 848-55.
- Adam, R. 2001. Biology of *Giardia Lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 110-40.
- Aguado, T., Bhutta, Z., De Oliveira, K., Neuzil, U., Parashar, D.S. 2009. Detailed Review Paper on Rotavirus Vaccines. Paper presented at: The WHO Strategic Advisory Group of Experts on Immunization; Geneva, Switzerland.
- Aguilar-Rojas, A., Olivo-Marin & Guillen, N. 2016. The motility of *Entamoeba histolytica*: finding ways to understand intestinal amoebiasis. *Current opinion of Microbiology.*, 34, 24-30.
- Ahmed, K.S., Siraj, N.M., Fitsumberhan, H., Isaac, S., Yohannes, S., Eman, D., Berhane, Y. & Araya, M. 2017. Knowledge, Attitude and Practice (KAP) Assessment of Intestinal Parasitic Infection among School Children in Asmara, Eritrea. *Health*, 9, 57-68.
- Aguiar, M.A. & Fachini, D. 2010. Prevalência de enteroparasitoses em escolares da comunidade da Serrinha, Florianópolis, SC. *Florianópolis*, 43.
- Akhtar, T., Khan, A.G., Ahmed, I., Nazli, R. & Haider, J. 2016. Prevalence of amoebiasis in a model research community and its confirmation using stool antigen ELISA for *Entamoeba histolytica*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29, 1587-90.
- Alemu, A., Tegegne, Y., Damte, T., & Melku, M. 2016. *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths among preschool-aged children in Chuahit, Dembia district, Northwest Ethiopia: prevalence, intensity of infection and associated risk factors, *BMC Public Health.*, 16, 1-9.
- Alfellani, M.A., Stensvold, C.R., Vidal-Lapiedra A., Onuoha, E.S., Fagbenro-Beyioku A.F. & Clark, C.G. 2013. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Trop.*, 126, 11–18.
- Al-kafri, A. & Harba, A. 2009. Intestinal Parasites in Basic Education Pupils in Urban and Rural Idlib. *Syrian Clinical Laboratory Reviews*, 5, 2–5.

- Allen H. 2008. Action against worms. World Health Organization, PPC Newsletter 11. Disponível em [www.int/wormcontrol](http://www.int/wormcontrol).
- Ali, I.K., Hossain, M.B., Roy, S., Ayeh-Kumi, P.F., Petri Jr, W.A., Haque, R. & Clark, G. 2003. *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.*, 9, 580-84.
- Ali, I.K.M., Clark, C.G. & Petri, W.A. J.R. 2008. Molecular Epidemiology of Amebiasis. *Infect Genet Evol.*, 8, 698–707.
- Almeida, L., Gomes, A., Siqueira-Batista, R., Palheta-Neto, F., Pezzin-Palheta, F., Feier, C. 2013. Himenolepíase - aspectos gerais. *Revista Brasileira de Medicina*.
- Alves, M., Xiao, L., Antunes, F. & Matos, O. 2006. Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 99, 287-92.
- Alves, M., Xiao, L., Sulaiman, I., Lal, A.A., Matos, O., & Antunes, F. 2003. Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J Clin Microbiol.*, 41, 2744–47.
- Alum A., Rubino, J.R. & Ijaz, M.K. 2010. The global war against intestinal parasites – should we use a holistic approach? *International Journal of Infection Diseases*, 14, 732-38.
- Amin, O.M. 2002. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am J Trop Med Hyg*, 66, 799–803.
- Andiran, N., Acikgoz, Z.C., Turkay, S. & Andiran, F. 2006. *Blastocystis hominis*, an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *J Pediatr Surg.*, 41, 1489–91.
- Andrade, E.C., Leite, I.C.G., Rodrigues, V.O. & Cesca, M.G. 2010. Parasitoses intestinais: uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *Revista de APS.*, 13, 231-40.
- Araújo, E.H.P. & Guimarães, S.S. 2000. Obstrução nasolacrimal em criança: *Ascaris lumbricoides* como uma causa incomum, *Arq. Bras. Oftalmol.* 63, 391-3.
- Ashikin A., Al-Mekhlafi, H.M., Moktar, N. & Anuar, T.S. 2017. Molecular detection and species identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolated from immunocompetent Orang Asli in Malaysia. *Parasitology International*, 1-3.
- Augusto, G., Nalá, R., Casmo, V., Sabonete, A., Mapaco, L. & Monteiro J. 2009. Geographic Distribution and Prevalence of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminths among Schoolchildren in Mozambique. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 81, 799-803.



- Ayinmode, A.B., Ojuromi, O.T. & Xiao, L. 2011. Molecular identification of *Enterocytozoon bieneusi* isolates from Nigerian children. *J Parasitol Res.*, 129542.
- Azizian, M., Basati, G., Abangah, G., Mahmoudi, M.R. & Mirzaei, A. 2016. Contribution of *Blastocystis hominis* subtypes and associated inflammatory factors in development of irritable bowel syndrome, *Parasitology research.*, 115, 2003-09.
- Babb, R. R., & Wagener, S. 1989. *Blastocystis hominis*—a potential intestinal pathogen. *West. J. Med.*, 151, 518–519.
- Baily, G. 2009. Other Cestode Infections: Intestinal Cestodes, Cysticercosis, Other Larval Cestode Infections. In COOK, Gordon C.; ZUMLA, Alimuddin I. – Manson's Tropical Diseases. 22<sup>a</sup> ed. Elsevier Saunders, ISBN 978-1-4160-4470-3. sec. 11. cap. 87. 1569-1583.
- Baker, M., & Prasad, B.V. 2010. «Rotavirus cell entry». *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 343, 121–48.
- Balci, Y., Türk, M., Polat, Y. & Erbil, N. 2009. The distribution of intestinal parasites among children in Denizli. *Turkiye Parazitol Derg*, 33, 298-300.
- Baldursson, S. & Karanis, P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks—an update 2004–2010. *Water Res* 45, 6603-14.
- Bánjai, K., László, B., Duqued, J., A. Steele, A.D., Anthony, E., Nelsonf, S., Jon, R., Gentschd, R. & Parashard, U.D. 2012. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. A122– A130.
- Barreto, T.C. 2012. Levantamento das principais parasitoses intestinais que acometem crianças da comunidade de Tamarindo em Campos dos Goyatazes, RJ. Perspectivas Online. *Biológicas e Saúde*, 7, 53-61.
- Bednarska, M., Bajer, A., Siński, E., Wolska-Kuśnierz, B., Samoliński, B. & Graczyk, T.M. 2014. Occurrence of intestinal microsporidia in immunodeficient patients in Poland, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21, 244–48.
- Belo, V.S., Oliveira, R.B., Fernandes, P.C., Nascimento, B.W.L., Fernandes, F.V., Castro, C.L.F., Santos, W.B. & Silva, E.S. 2011. Factors associated with intestinal parasitosis in the population of children and adolescents, *Revista Paulista de Pediatria.*, 30,195-201.
- Benouis, A., Bekkouche, Z. & Benmansour, Z. 2013. Etude épidémiologique des parasitoses intestinales humaines au niveau du C.H.U. d'Oran (Algérie). Oran : *Innovative Space of Scientific Research Journals*, 2, 613-20.

- Benzerroug, A.B. 2005. Enquête sur la prévalence des parasitoses intestinales dans les ecoles et les jardins d'enfants au Cap Vert (Novembre 2004- Avril 2005). Universidade Jean Piaget Cabo Verde.
- Bethony, J., Brooker, S., Albonico, M., Geiger, S.M., Loukas, A., Diemert, D., & Hotez, P.J., 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm *Lancet.*, 367, 1521–32.
- Beyhan, Y.E., Yilmaz, H., Cengiz, Z.T & Ekici, A. 2015. Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. *Saudi Medical Journal.* 36, 1118- 21.
- Bigliardi, E. & Sacchi, L. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and infection*, 3, 373-9.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes I.H., & Ruck B.J. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.*, 2, 1281–3.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., & Ruck, B.J. 1973. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet.*, 303, 149-151.
- Boisson, S., Engels, D., Gordon, B.A., Medlicott, K.O., Neira, M.P., Montresor, A., Solomon, A.W. & Velleman, Y. 2015. Water, sanitation and hygiene for accelerating and sustaining progress on neglected tropical diseases: a new Global Strategy 2015–20, 1, i19–i21.
- Boileau, M., Ferreira, J., Ahmad, I., Lavallée, C., Qvarnstrom, Y., & Dufresne, S.F. 2016. Successful Treatment of Disseminated *Anncaliia algerae* Microsporidial Infection with Combination Fumagillin and Albendazole, *Open Forum Infectious Diseases Brief Report.*, 1-3.
- Borad, A. & Ward, H. 2010. Human immune responses in cryptosporidiosis. *Future Microbiol.*, 5, 507-19.
- Boreham, P. F. & Stenzel, D.J. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.*, 32, 1–70.
- Borges, W.F., Marciano, F.M., Oliveira, H.B. 2011. Parasitos intestinais: elevada prevalência de *Giardia lamblia* em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde da região sudeste de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 40, 149-57.
- Borowski, H., Thompson, R., Armstrong, T., & Clode, P. 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system. *Parasitology*, 137, 13–26.
- Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X., Okome-Nkoumou, M., Nzamba, C., Kombila, M., Accoceberry, I. & Thellier, M. 2007. New highly divergent

rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol*, 45, 2580–8.

Brites, C., Barberino, Bastos, M.A., Sampaio, M.S. & Silva, N. 1997. *Blastocystis hominis* as a potential cause of diarrhoea in AIDS patients: a report of six cases in Bahia. *Braz. J. Infect. Dis.*, 1, 91–4.

Brooker, S., & Bundy, D. A. P. 2009. – Soil-transmitted Helminths (Geohelminths). In COOK, Gordon C.; ZUMLA, Alimuddin I. – *Manson's Tropical Diseases*. 22<sup>a</sup> ed. *Elsevier Saunders*., 85, 1515-48.

Brooker, S., Clements, A.C.A., & Bundy, D.A.P. 2006. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol.*, 62, 221-61.

Brooker, S., Kabatereine, N.B., Smith, J.L., Mupfasoni, D. 2009. An updated atlas of human helminth infections: the example of East Africa, *International Journal of Health Geographics*., 42, 1-11.

Cabeza, M.I., Cabezas, M.T., Cobo, F., Salas, J., & Vázquez, J. 2015. *Hymenolepis nana*: factores asociados a este parasitismo en un área de salud del Sur de España, *Rev Chilena Infectol* 32, 593-5.

Cacciò, S.M., Giacomo, M. & Pozio, E. 2002. Sequence analysis of the  $\beta$ -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal Parasitology*, 32, 1023-30.

Cacciò, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A. & Pozio, E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A e B. *Int J Parasitol.*, 38, 1523-31.

Cali, A., & Takvorian, P. M. 1999. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In M. Wittner & L. M. Weiss (Eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*., 85-128.

Cama, V.A., M. Ross, J.M., Crawford, S., Kawai, V., Chavez-Valdez, R., Vargas, D., Vivar, A., Ticona, E., Ñavincopa, M., Williamson, J., Ortega, Y., Gilman, R.H., Bern, C. & Xiao, L. 2007. Differences in Clinical Manifestations among *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV-Infected Persons. *Infect Dis.*, 196, 684-91.

Capete B.P., Virkel G.L. & Lanusse C.E. 2009. Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: pharmacological implications. *Veterinary Journal*, 10, 1-20.

Carey, C., Lee, H., & Trevors, J. 2004. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38, 818-62.

- Carneiro, F.F., Cifuentes, E., Tellez-Rojó, M.M. & Romieu, I. 2002. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an environmental health indicator to guide preventive activities in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization*, 80, 40-46.
- Carrascosa, M., Martínez, J. & Pérez-Castrillón, J.L. 1996. Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* infection. *Ann Intern Med.*, 124, 278–9.
- Carrero, S.H.S. 2013. Prevalencia de parásitos intestinales y factores de riesgo en escolares del colegio Chicamocha Kennedy I del municipio de Tuta, Boyacá –Colombia. *Universidad y Salud.*, 15, 218-24.
- Casemore, D., Armstrong, M. & Sands, R. 1985. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology*, 38, 1337-41.
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>. (Acedido em 10 de maio de 2016).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd>
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/nonpathprotozoa/biology.html>. (Acedido em 10 de maio de 2016)
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/index.html>. (Acedido em 10 de Maio de 2016).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/enteromonas/index.html>. (Acedido em 15 Maio de 2017).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. [www.cdc.gov/dpdx/enteromonas/index.html](http://www.cdc.gov/dpdx/enteromonas/index.html). (Acedido em 15 de Maio de 2017).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/enteromonas/index.html>. (Acedido em 15 de Maio de 2017).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/enteromonas/index.html>. (Acedido em 15 de Maio de 2017).
- CDC. 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/parasites/hymenolepis/biology.html>. (Acedido em 10 de junho de 2016).

- Cevallos, A., Zhang, X., Waldor, M. Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M. & Ward, H. 2000. Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium*. *Infection and Immunity*, 68, 4108-16.
- Chacon-Cruz, E. & Mitchell, D. 2009. Intestinal Protozoal Diseases.
- Chalmers, R.M., & Davies, A.P. 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental parasitology*, 124, 138-46.
- Chehter, L., & Cabeça, M. 2010. Parasitose Intestinais. São Paulo: MOREIRA JR.
- Chen, X.M., Keithly, J.S., Paya, C.V. & LaRusso, N.F. 2002. *N Engl J Med.*, 30, 1723-31.
- Chesnaye, N., Sinuon, M., Socheat, D., Koporc, K. & Mathieu, E. 2011. Treatment coverage survey after a school-based mass distribution of mebendazole: Kampot Province, Cambodia. *Acta tropica.*, 118, 21-6.
- Chin, Y.T., Lim, Y.A.L., Chong, C.W., Teh, C.S.J., Yap, I.K.S., Lee, S.C., Tee, M.Z., Siow, V.W.Y. & Chua, K.H. 2016. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism among two indigenous sub- ethnic groups in Peninsular Malaysia. *Infectious diseases of poverty.*, 5, 1-15.
- Chu, P., & West, A.B. 1996. *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*: cytologic, histologic, and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. *Am.J. Clin.Pathol.*, 106, 606-14.
- Clark, C.G., van der Giezen, M., Alfellani, M.A. & Stensvold, C.R. 2013. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.*, 82, 1–32.
- Clark, D.P. 1999. New insights into human cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews.*, 12, 554–63.
- Cooper, P.J., Alexander, N., Moncayo, A.L., Benitez, S.M. Martha E Chico, M.E., Vaca, M.G. & Griffin, G.E. 2008. Environmental determinants of total IgE among school children living in the rural Tropics: importance of geohelminth infections and effect of anthelmintic treatment. *BMC Immunology.*, 9, 1-11.
- Coradi, S.T. 2010. Epidemiologia das parasitoses intestinais e caracterização genotípica de isolados de *Giardia duodenalis* de Escolares do Município de Pratânia, Estado de São Paulo [Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais para obtenção do título de Doutor]. Faculdade de Medicina de Botucatu: Unesp.
- Corradi, N., & Keeling, P. J. 2009. Microsporidia. a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, 23, 1-8.
- Conteas, C. N., Sowerby, T., Berlin, G. W., Dahlan, F., Nguyen, A., Porschen, R., Donovan, J., LaRiviere, M., & Orenstein, J. M. 1996. Fluorescence techniques for

diagnosing intestinal microsporidiosis in stool, enteric fluid, and biopsy specimens from acquired immunodeficiency syndrome patients with chronic diarrhea. *Arch. Pathol. Lab Med.*, 120, 847-53.

Costamagna, S.R., Visciarelli, E., Lucchi, L.D. & Basualdo, J.A. 2005. Parásitos en aguas del arroyo Naposta, aguas de recreación y de consumo en la ciudad de Bahia Blanca (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Parasitologia Latinoamericana*, 60, 122-6.

Coyle, C.M. Varughese, J., Weiss, L.M. & Tanowitz, H.B. 2012. Blastocystis: To Treat or Not to Treat.... *Clinical Infectious Diseases*, 54, 105-10.

Cui, S., Tobe, R.G., Mo, X., Liu, X. Xu, L. & Li, S. 2016. Cost-effectiveness analysis of rotavirus vaccination in China: Projected possibility of scale-up from the current domestic option. *BMC Infectious Diseases.*, 16, 1-10.

Culture Grams TM. 2003. Africa. Republic of Cape Verde. Axiom Press. Disponível em [www.culturegrams.com](http://www.culturegrams.com)

Current, W., & Garcia, L. 1991. Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews.*, 4, 325-58.

Das, J.K., Ali, A., Salam, R.A., & Bhutta, Z.A. 2013. Antibiotics for the treatment of Cholera, Shigella and *Cryptosporidium* in children, *BMC Public Health.*, 13, 1-9.

Dennehy, P.H. M.D. 2000. Transmission of rotavirus and other enteric pathogens in the home. *Pediatr Infect Dis J.*, 19, 103-5.

Dent, A.E. & Kazura, J.W. 2011. Ascariasis (*Ascaris lumbricoides*). In Kliegman, Robert M. [et al.] – Nelson Textbook of Pediatrics. 19<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 283, 217-18.

Desportes, I., Le, C. Y., Galian, A., Bernard, E., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. & Modigliani, R. 1985. Occurrence of a new microsporidian : Enterocytozoon bienewisi n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.*, 32, 250-4.

Dhurga, D. B., Suresh, K.S. & Tan, T.C. 2016. Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis* sp. Exposed to Metronidazole (MTZ). *PLOS ONE*, 11, 1-18.

Diamond, L.S. & Clark, C.G. 1993. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol.*, 77, 450-5.

Didier, E. S. 1998. Microsporidiosis. *Clin. Infect. Dis.*, 27, 1-7.

Didier, E.S. 2005. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals, *Acta Tropica*, 94, 61-76.

- Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L. B. & Janney, F. A. 1995a. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 3138-45.
- Didier, E.S., Snowden, K.F. & Shadduck, J.A. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals, *Advances in Parasitology*, 40, 283-320.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C. & Shadduck, J. A. 1995b. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111, 411-21.
- Didier, E. S. & Weiss, L. M. 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 19, 485-92.
- Dillingham, R., Lima, A. & Guerrant, R. 2002. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection*, 4, 1059-66.
- Diouf, C., Kane, A., Ndoeye, N.A., Ndour, O., Faye-Fall, A.L., Fall, M., Alumeti, D.M. & Ngom, G. 2016. Volvulus du grêle sur paquet d'ascaris : à propos d'un cas. *Pan African Medical Journal* ,24, 1-5.
- Dongre, A.R., Deshmukh, P.R., Boratne, A.V., Thaware, P. & Garg, B.S. 2008. An approach to hygiene education among rural Indian school going children. *Journal of Health and Allied Sciences*, 6, 1-6.
- Dumba, R., Kaddu, J.B. & Mngen, F.W. 2008. Intestinal helminthes in Luweero district, Uganda. *African Health Sciences*, 8, 90-5.
- Dupont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B. & Jakubowski, W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 332, 855-9.
- Egyed, Z. Sréter, T. Széll, Z. & Varga, I. 2003. Characterization of *Cryptosporidium* spp.- recent developments and future needs. *Veterinary Parasitology*, 111, 103-14.
- Eibach, D., Ralf, K., Hassan, M.A., Nimako, S. Ralf, M.H., Yaw, A., Egbert, T. & Jürgen, M. 2015. Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. among Children in Rural Ghana. *PLOS Neglected Tropical Diseases*,9, 1-12.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S. & Svard, S.G. 2016. An update on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52.
- Elqaj, M., Belghyti, D., Ahami, A., Loutfi, H., Elkharrim, K. & Taboz, Y. 2009. Prévalence des parasitoses intestinales chez les écoliers en milieu rural à Kénitra (Maroc). Kénitra: *World Journal of Biological Research*, 002, 1-6.
- Elyana, N.F., Al-mekhlafil, H.M., Ithoil, I., Abdulsalam, A.M., Dawaki, S., Nasr, N.A., Atroosh, W.M., Abd-Basher, M.H., Al-Areeqi, M.A., Sady, H., Subramaniam, L.R.,

- Shahrul Anuar, T.S., Lau, Y.L., Moktar, N. & Surin, J. 2016. A tale of two communities: intestinal polyparasitism among Orang Asli and Malay communities in rural Terengganu, Malaysia. *Parasites & Vectors*, 9, 1-17.
- Emile, N., Bosco, N.J. & Karine, B. 2013. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Kigali. *Institute of Education students in Kigali, Rwanda*, 30, 718–26.
- EPA. 1999, *Giardia: Risk for Infants and Children*, United States Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology, Office of Water, Washington DC.
- Esch, K.J. & Petersen, C.A. 2013. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews* 26, 58–85.
- Esporn, A., Morio, F., Miegerville, M., Illa, H., Abdoulaye, M., Meyssonier, V., Adehossi, E., Lejeune, A., Cam, P.D., Besse, B. & Gay-Andrieu, F.G. 2007. Molecular study of microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.*, 45, 2999–3002.
- Esteves, A. Nordgren, J. Pereira, J. Fortes, F. Dimbu, R. Saraiva, N. Mendes, C. & Istrate, C. 2016. Molecular Epidemiology of Rotavirus in Four Provinces of Angola Before Vaccine Introduction. *Journal of Medical Virology*, 1-10.
- Fallahi, SH. Rostami, A. Mohammadi, M. Ebrahimzaden, F. & Pournia, Y. 2015. Practical parasitology courses and infection with intestinal parasites in students. *Journal of infection and public health*, 523, 1-7.
- Farthing, M.J., Cevallos, A.M. & Kelly, P. 2009. Intestinal Protozoa G Cook (Ed.), Manson's Tropical Diseases, WB Saunders, London (1996), 1255–70.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology*, 126, 37-56.
- Fayer, R. 2008. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. & Xiao, L. (eds.). *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. 2th ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1-42.
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124, 90-7.
- Fayer, R. Morgan, U. & Upton, S.J. 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30, 1305-22.
- Fayer, R. & Ungar, B. 1986. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiological Reviews*, 50, 458-83.



- Feng, Y. & Xiao, L. 2011. Zoonotic potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2481, 110-40.
- Fernandes, S., Beorlegui, M., Brito, M.J. & Rocha, G. 2011. Protocolo de parasitoses intestinais. *Acta Pediatr Port*, 43, 35-41.
- Ferson, M.J. 1997. Infection control in child care settings. *Comunicável diseases inteligente*, 21, 333-7.
- Ferreira, U.M., Ferreira, C.S. & Monteiro, C.A. 2000. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Revista Saúde Pública*, São Paulo, 34, 73-82.
- Flewett, T.H., Bryden, A.S. & Davies H. 1973. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. 2, 1497-1497.
- Fischer, T.K., & Gentsch, J.R. 2004. Rotavirus typing methods and algorithms. *Rev Med Virol.*, 14, 71-82.
- Forsell, J., Granlund, M., Samuelsson, L., Koskiniemi, S., Edebro, H. & Evengård, B. 2016. High occurrence of *Blastocystis* sp. subtypes 1-3 and *Giardia intestinalis* assemblage B among patients in Zanzibar, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 10, 1-12.
- Fotedar, R., Stark, D., Beebe, N. Marriott, D., Ellis, J. & Harkness, J. 2007. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* species. *CLIN.MICROBIOL.REV.*, 20, 511-32.
- Franco, R.M.B. 2007. Waterborne Protozoa: relevance in public health. *Rev Panam Infectol.*, 9, 36-43.
- Franzen, C. 2004. Microsporidia: how can they invade other cells? *Trends Parasitol.*, 20, 275-9.
- Franzen, C. 2008. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal*, 2, 1-34.
- Franzen, C. & Müller, A. 1999b. Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. *Clin.Microbiol.Rev.*, 12, 243-285.
- Franzen, C. & Müller, A. 2001. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*, 3,389-400.
- García, L., Campos, A. & Cardoso J.E. 2005. Genotype of *Giardia intestinalis* isolates from children and dogs and its relationship to host origin. *Parasit Res.*, 97, 1-6.
- Garcia, L.S. & Robyn, Y.S. 1997. Evaluation of Nine Immunoassay Kits (Enzyme Immunoassay and Direct Fluorescence) for Detection of *Giardia lamblia* and

- Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1526- 9.
- Garcia, L.S., Shimizu, R.Y. 1997. Evaluation of Nine Immunoassay Kits (Enzyme Immunoassay and Direct Fluorescence) for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens, *Journal of clinical microbiology*, Vol. 35, No. 6, 1526–9.
- Gardner, T.B. & Hill, D.R. 2001. Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 114-28.
- Gasparinho, C., Mirante, M.C., Lima, S.C., Istrate, I., Mayer A.C., Tavira, L. Nery, S.V. & Brito, M. 2016. Etiology of Diarrhea in Children Younger Than 5 Years Attending the Bengo General Hospital in Angola. *Pediatr Infect Dis J*, 35, 28-34.
- Gatei, W., Hart, C.A., Gilman, R.H., Das, P., Cama, V. & Xiao, L. 2006a. Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53, S43–S48.
- Geck, M. J., Yoo, S. & Wang, J. C. 2001. Assessment of cervical ligamentous injury in trauma patients using MRI. *J Spinal Disord*, 14, 371-7.
- Ghenghesh, K.S., Ghanghish, K., BenDarif, E.T., Shembesh, K. & Franka, E. 2016. Prevalence of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in Lybia :2000-2015. *Libyan Journal of Medicine*, 11, 1-6.
- Ghoshal, U., Dey, A., Ranjan, P., Khanduja, S., Agarwal, V. & Ghoshal, U.C. 2015. Identification of opportunistic enteric parasites among immunocompetent patients with diarrhoea from Northern India and genetic characterisation of *Cryptosporidium* and *Microsporidia*. *Indian journal of medical microbiology*, 34, 357-63.
- Gier, B., Ponce, M., De Boor, M., Doak, C. & Katja Polman, K. 2014. Helminth infections and micronutrients in school-age children; a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 1499-1509.
- Gogoi, S. & Yadav, A.K. 2016. In vitro and in vivo anthelmintic effects of *Caesalpinia bonducella* (L.) Roxb. leaf extract on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) and *Syphacia obvelata* (Nematoda). *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5, 427-33.
- Gonçalves, A.L.R., Belizário, T.L., Pimente, J.B., Penatti, M.P.A. & Pedroso, R.S. 2011. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, 191-3.
- Goodgame, R., Stager, C., Marcantel, B., Alcocer, E. & Segura, A. M. 1999. Intensity of infection in AIDS-related intestinal microsporidiosis. *J.Infect.Dis.*, 180, 929-32.

- Gotfred-Rasmussen, H. Lund, M. Enemark, H.I. Erlandsen, M. & Petersen, E. 2015. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 84, 187-90.
- Govcv. 2017. Governo de Cabo Verde. Casa para Todos: Portugal e Cabo Verde procuram soluções que satisfaçam interesses mútuos. <http://www.governo.cv/index.php/destaques/7409-casa-para-todos-portugal-e-cabo-verde-procuram-solucoes-que-satisfacam-interesses-mutuos>.
- Govind, A. & Rajamanikam, K.S. 2013. Amoebic forms of *Blastocystis* spp. – evidence for a pathogenic role. *Parasites & Vectors*, 6, 295.
- Grácio, M.A.A. 1988. Schistosomiasis (bilharziasis) in São Tomé e Príncipe. 1. Preliminary study on natural infection of *Bulinus* snails. XII th International Congress of Tropical Medicine and Malaria. Abstracts, Kager, P. A. & Polderman, A. M. (editors): 277.
- Greenberg, H.B. & Estess, M.K. 2009. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. *Gastroenterology*. 136, 1939–51.
- Griffiths, J.K. 1998. Human cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, and diagnosis. *Advances in Parasitology* 40: 37-85.
- Gryschek, R.C.B. & Lescano, S.A.Z. ‘Ascaridíase’ in NETO, VA; AMATO, VS; TUON, FF. 2008. Parasitologia uma abordagem clínica. *Elsevier Editora Lda.*, 239-43.
- Guerrant, R.L. 1997. Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Disease*, 3, 51-7.
- Gurgel, R.Q., Cardoso, G.S., Silva, A.M., Santos, L.N. & Oliveira, R.C.V. 2005. Children day care center: exposition or protection environment to intestinal parasites infestation in Aracaju, SE. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 267-69.
- Halaby, M.N., Shalaby, M.N. 2016. Effect of *Ascaris lumbricoides* infection on T helper cell type 2 in rural egyptian children. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 12, 379–85.
- Halliez, C.M., & Buret, A.G. 2015. Gastrointestinal Parasites and the Neural Control of Gut Functions. *Frontiers in Celular Neurosciense*, 9, 1-20.
- Harhay, M.O., Horton, J. & Olliaro, P.L. 2010. Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8, 219–34.
- Hariharan, Jayaram, M K., Esteves, B.V. & Prasad, V. 2004. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Research*. 101, 67–81.

- Haque, R. Ali, I.K.M. Clark, C.G. & Petri Jr, W.A. 1998. A case report of *Entamoeba moshkovskii* infection in a Bangladeshi child. *Int Parasitol.*, 47, 201-202.
- Harpham, T. & Stephens C. 1991. Urbanization and health in developing countries. *World Health Stat Q.*, 44, 62-9.
- Haro, M., Del, A. C., Fenoy, S. & Henriques-Gil, N. 2003. Intraspecies genotype variability of the microsporidian parasite *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin.Microbiol.*, 41, 4166-71.
- Hayman, J.R., Southern, T.R. & Nash, T.E. 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells *in vitro*. *Infection and Immunity* ,73, 841-8.
- Heller, L., Bastos, R.K.X., Vieira, M.B.C.M., Bevilacqua, P.D., Brito, L.L.A., Mota, S.M.M., Oliveira, A.A., P.M.M. Salvador, D.P. & Cardoso, A.B. 2004 Os cistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos de saúde humana. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 13, 79-92.
- Heyworth, M.F. 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite*, 23, 1-5.
- Hijawi, N.S. Meloni, B.P. Ryan, U.M. Olson, M.E. & Thompson, R.C. 2002. Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology*, 32, 1719-26.
- Hotez, P.J., Alvarado, M., Basáñez, M.G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S.J., Brown, A.S., Buckle, G., Budke, C.M., Carabin, H., Coffeng, L.E., Fèvre, E.M., Fürst, T., Halasa, Y.A., Jasrasaria, R., Johns, N.E., Keiser, J., King, C.H., Lozano, R., Murdoch, M.E., O'Hanlon, S., Pion, S.D., Pullan, R.L., Ramaiah, K.D., Roberts, T., Shepard, D.S., Smith, J.L., Stolk, W.A., Undurraga, E.A., Utzinger, J., Wang, M., Murray, C.J. & Naghavi, M. 2014. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, 1-9.
- Hotez, P.J., Brindley, P., Bethony, J., King, C. 2016. The Journal of Clinical Investigation, 48, 1311-21.
- Hotez, P.J. & Pecoul, B. 2010. “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.*, 4, 1-7.
- Houmsou, R., Amuta, E. & Olusi, T. 2009. Prevalence of intestinal parasites among primary school children in Makurdi, Benue State Nigeria. *The Internet Journal of Infectious Diseases*, 8, 1-5.
- Huang, D.B. Chappell, C. & Okhuysen, P.C. 2004. Cryptosporidiosis in children. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15, 253-59.

- Huggins, D.W., Medeiros, L. B., & Oliveira, E. R. 1993. Himenolepíase. Atualização e prevalência no Hospital de UFPE. *Rev. Pat. Trop.*, 22, 57- 70.
- Hunter, P. & Nichols, G. 2002. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 145-54.
- Hürlimann, E., Yapi, R.B., Hounbedji, C.A., Schmidlin, T., Kouadio, B.A., Silué, K.D., Ouattara, M., N’Goran, E.K., Utzinger, J. & Raso, G. 2014. The epidemiology of polyparasitism and implications for morbidity in two rural communities of Côte d’Ivoire. *Parasites & Vectors*, 8, 1-14.
- Ibarra, C., Herrera, V., Arce, E.P., Gil, L.C., Madrid, A.M., Valenzuela, L. & Beltrán, C.J. 2016. Parasitosis y síndrome de intestino irritable, *Rev Chilena Infectol*, 33, 268-74.
- Ignatius, R., Gahutu, J.B., Klotz, C. Steininger, C., Shyirambere, C. *et al.*, 2012. ‘High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children’. *PLoS Negl Trop Dis*, 6.
- Istrate, C.M., Hagbom, E., Vikstrom, K.E. & Svensson. L. 2013. Rotavirus infection increases intestinal motility but not permeability at the onset of diarrhoea. *J Virol.*, 88, 3161-9.
- INE, Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde. 2010. <http://www.ine.cv>. (Acedido a 6 de Abril de 2016).
- Jarrad, A.M., Debnath, A., Miyamoto, Y., Handsford, K.A., Pelingon, R., Butler, M.S., Bains, T., Karoli, T., Blaskovich, M.A.T., Eckmann, L. & Cooper, M.A. 2016. Nitroimidazole carboxamides as antiparasitic agents targeting *Giardia lamblia*. *European journal of medicinal chemistry*, 120, 353-62.
- Jex, A.R. & Grasser, R.B. 2010. Genetic richness and diversity in *Cryptosporidium hominis* and *C. parvum* reveals major Knowledge gaps and a need for the application of "next generation " technologies- Research review. *Biotechnology Advances* 28, 17-26.
- Jex, A.R., Smith, H.V., Monis, P.T., Campbell, B.E. & Gasser, R.B. 2008a. *Cryptosporidium*-Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26, 304-17.
- Kapikian A.Z. 1974. Norwalk and Norwalk-like viruses. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: *Marcel Dekker*. 2nd ed.
- Kappagoda, S., Singh, U. & Blackburn, B.G. 2011. Antiparasitic Therapy. *Mayo Clin Proc.*, 86, 561–83.
- Karadam, S.Y. Ertuğ, S. Ertabaklar, H. 2015. Comparative Evaluation of Three Methods (Microscopic Examination, Direct Fluorescent Antibody Assay, and Immunochromatographic Method) for the Diagnosis of *Giardia Intestinalis* from Stool Specimens, *Turkiye Parazitol Derg*, 40, 22-5.

- Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C. M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Pap-adopoulou, C. & Vakalis, N. 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Derm. Venereol*, 88, 80–81.
- Keiser J., Utzinger J. 2008. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 299, 1937-48.
- Khan, M.Y. 1979. An analytical study of factors related to infestation by intestinal parasites in rural school children (report of a pilot study). *Public Health*, 93, 82–8.
- Khan, W.A., Rogers, K.A., Karim, M.M., Ahmed, S., Hiberd, P.L., Calderwood, S.B., Ryan, E.T. & Ward, H.D. 2004. Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, case-control study of clinical features, epidemiology and systemic antibody response. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 412-19.
- Khanna, V. TilaK, K. MuKhopadhyay, C. & Khanna, R. 2015. Significance of Diagnosing Parasitic Infestation in Evaluation of Unexplained Eosinophilia, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9, 22-4.
- Khuroo, M.S. Rather, A.A. Khuroo, N.S. Khuroo, K.S. 2016. Hepatobiliary and pancreatic ascariasis. *World J Gastroenterol*, 22, 7507-17.
- Kiani, H., Haghighi, A., Rostami, A., Azargashb, E., Tabaei, S.J.S., Solgi, A. & Zebardast, N. 2016. Prevalence, risk factors and symptoms associated to intestinal parasite infections among patients with gastrointestinal disorders in nahavand, western Iran, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 1-7.
- Komagome, S.H., Romagnoli M.P.M., Previdelli, I.T.S., Falavigna, D.L.M., Dias, M.G.G. & Gomes, M.L. 2007. Fatores de risco para infecção parasitária intestinal em crianças e funcionários de creche. *Cienc Cuid Saude*., 6, 442-447.
- Kosek, M. Alcantara, C. Lima, A.A. & Guerrant, R.C. 2001 Cryptosporidiosis: an update. *The Lancet infectious diseases*, 1 (4), pp. 262-269.
- Kotler, D.P. & Orenstein, J. M. 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advances in Parasitology*, 40, 321-49.
- Kramer, J. P. 1970. Longevity of microsporidian spores with special reference to *Octospora muscae-domesticae* flu. *Acta Protozool.*, 8, 217-24.
- Kudo, R. R. 1947. Protozoology. Illinois: Springfield.
- Lader, K. Hellard, M.E. Sinclair, M.I. Fairley, C.K. & Wolfe, R. 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompromised individuals. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20, 1390–94.

- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D. & Caccio S.M. 2005a. Genetic heterogeneity at the  $\beta$ -giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal Parasitology*, 35, 207-13.
- Lanata, F., Christa, L., Fischer-Walker, A., Olascoaga, C., Torres, C.X., Martin, J.A. Aryee & Robert E.B. 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PloS one*. 8, e72788.
- Leav, B.A., Mackay, M.R., Anyanwu, A., O'connor, R.M., Cevallos, A.M., Kindra, G. Rollins, N.C., Bennish, M.L., Nelson, R.G. & WARD, H.D. 2002. Analysis of sequence diversity at the highly polymorphic Cpgp40/15 locus among *Cryptosporidium* isolates from human immunodeficiency virus-infected children in South Africa. *Infection and Immunity*, 70, 3881-90.
- Leav, B.A., Mackay, M. & Ward, H.D. 2003. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 903-8.
- Leder, K., Hellard, M.E., Sinclair, M.I., Fairley, C.K. & Wolfe, R. 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20, 1390-4.
- Leite, R.O., Toma, H.K. & Adamil, Y.L. 2014. Diagnóstico parasitológico e molecular de enteroparasitoses entre crianças residentes e funcionários de uma instituição beneficente para menores no município de Niterói- RJ, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 43,446- 58.
- Leoni, F., Mallon, M.E., Smith, H.V., Tait, A. & McLauchlin, J. 2007. Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. Parvum* from sporadic cases in livestock in the UK. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3286-94.
- Leung, M.J., Hong, C.T.T., Trung, N.H.D. & Thi, H.N., Minh, C.N.N., Thi, T.V., Hong, D.T., Man, D.N.H., Knowles, S.C.L., Wolbers, M., Hoang, N.L.T., Thwaites, G., Graha, A.L. & Baker, S. 2016. The impact of albendazole treatment on the incidence of viral- and bacterial-induced diarrhea in school children in southern Vietnam: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 17, 279, 1-12.
- Liao, C.W., Chiu, K.C., Chiang, I.C., Cheng, P.C., Chuang, T.W., Kuo, J.H., Tu, Y.H. & Fan, C.K. 2017. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Parasitic Infection in Schoolchildren in Battambang, Cambodia. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 10.
- Li, J., Luo, N., Wang, C., Qi, M., Cao, J., Cui, Z., Huang, J., Wang, R. & Zhang, L. 2016. Occurrence, molecular characterization and predominant genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in dairy cattle in Henan and Ningxia, China. *Parasites & Vectors*, 9, 1-5.

- Li, W., Deng, L., Yu, X., Zhong, Z., Wang, Q., Liu, X., Niu, L., Xie, N., Deng, J., Lei, S., Wang, L., Gong, C., Zhou, Z., Hu, Y., Fu, H., Xu, H., Geng, Y. & Peng, G. 2016. Multilocus genotypes and broad host-range of *Enterocytozoon bieneusi* in captive wildlife at zoological gardens in China. *Parasites & Vectors*, 9, 1-9.
- Liguory, O., Sarfati, C., Derouin, F. & Molina, J.M. 2001. “Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2672–74.
- Lindsay, D.S. Upton, S.J. Owens, D.S. Morgan, U.M. Mead, J.R. & Blagburn, B.L. 2000. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 91-5.
- Liya, H., Crawford, S.E., Joseph, M.H., Estes, M.K. & Prasad, V.B.V. 2012. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Elsevier, Current Opinion in Virology*. 2, 380–8.
- Lobo, M.L., Xiao, L., Antunes, F., Matos, O. 2012. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: a 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol* 42, 197–205.
- Lobo., M.L., Augusto. J., Antunes. F., Ceita. J., Xiao. L., Codices. V. & Matos. O. 2014. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi* and Other Intestinal Parasites in Young Children in Lobata Province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *PLOS ONE* / [www.plosone.org](http://www.plosone.org), 9, 1-10.
- Lopes, L.M., Santos, E.S., Savegnago, T.L., Salvador, F.A. & Ribeiro-Barbosa, E.R. 2010. Occurrence of intestinal parasites and commensals among children of Vila Inglesa, community of São Paulo, State of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 69, 252-4.
- Ludwig, K.M., Frei, F., Filho, F.A & Ribeiro-Paes, J.T. 1991. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med trop.*, 32, 47-55.
- Luong, T.V. 2003. De-worming school children and hygiene intervention. *International Journal of Environmental Health Research*, 13, 153-9.
- Lustigman, S., Prichard, R.K., Gazzinelli, A., Grant, W.N., Boatín, B.A., McCarthy, J.S. & Mari´a-Gloria Basáñez, M.G. 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: the problem of helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 6, 1-13.
- Macedo, H. 2005. Prevalência de parasitos e comensais intestinais em crianças de escolas da rede pública municipal de Paracatu (MG). Paracatu: *Rev. Bras. Anal. Clín.*, 37, 209-13.
- Machado, E.R. & Costa-Cruz, J.M. 2008. Enteroparasitas e comensais em crianças de quatro bairros da periferia de Uberlândia, Estado de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 41, 581-5.



- Mackey, T.K., Liang, B., Cuomo, R., Hafen, R., Brouwer, K.C. & Daniel E. Lee, D.E. 2014. Emerging and reemrgine Neglected Tropical Diseases: a review of key characteristics, Risk Factors and the Policy and Innovation Environment. *CMR*, 27, 949-79.
- Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M. H., Schaefer 3rd, F. W., Jakubowski, W. & Atlas, R.M. 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J. Clin. Microbiol.*, 30, 174-8.
- Mansfield, K.G., Carville, A., Shvetz, D., MacKey, J., Tzipori, S. & Lackner, A.A. 1997. Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian parasite in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepato- biliary disease. *American Journal of Pathology*, 150, 1395–405,
- Martins, C.M.C. Pires, C.M. & Dias, L.M.A. 2012. Estudo de Prevalência de Parasitas Intestinais nas crianças dos 2 a 12 anos da Comunidade de Rincão – Santa Catarina.
- Matos, O., Lobo, M.L. & Xiao, L. 2012. Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *Journal of Parasitology Research*, 1-19.
- Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H. & Hagiware, S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *A.M.A. Arch.Pathol.*, 67, 181-7.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. & Johne, R. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 157:1177–82.
- Mathis, A., Tanner, I., Weber, R. & Deplazes, P. 1999b. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int.J. Parasitol.*, 29, 767-70.
- Mathis, A., Weber, R. & Deplazes, P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin.Microbiol.Rev.*, 18, 423-45.
- Matthys, B., Bobieva, M., Karimova, G., Mengliboeva, Z., Jean-Richard, V., Hoimnazarova, M., Kurbonova, Lohourignon, L.K., Utzinger, J. & Wyss, K. 2011. Prevalence and risk factors of helminths and intestinal protozoa infections among children from primary schools in western Tajikistan. *Parasites & vectors*, 4, 1.
- McGlade, T.R., Robertson, I.D., Elliot, A.D. & Thompson, R.C.A. 2003. High Prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Science Elsevier*, 110, 197-205.
- Mehraj, V., Hatcher, J., Akhtar, S., Rafique, G. & Beg, M.A. 2008. Prevalence and Factors Associated with Intestinal Parasitic Infection among Children in an Urban Slum of Karachi. *PLoS ONE* 3, 1-6.
- Melo, M.B., Klem, V.G., Mota, J.A. & Penna, F. J. 2004. Parasitoses Intestinais. Minas Gerais: *Rev Med*.

- Meloni, D., Sanci, G., Poirier, P., Alaoui, H.E., Magali, Delhaes, L. Dei-Cas, E., Delbac, F., Fiori, P.L., Cave, D.D. & Viscogliosi, E. 2011. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res.*, 109, 613–19.
- Mi-Ichi, F., Yoshida, H. & Hamano, S. 2016. *Entamoeba* Encystation: New Targets to Prevent the Transmission of Amebiasis. *PLoS Pathog.*, 10, 1-13.
- Ministério da Saúde. 2005. Política Nacional de Informação Sanitária. Praia. <https://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentosite/11-politica-de-informacao-sanitaria/file>. (Acedido em 10 de Abril de 2016).
- Ministério da Saúde de Cabo Verde. 2007. Programa Nacional de Saúde Escolar, p. 29. Cidade da Praia.
- Ministério da Saúde de Cabo Verde. 2009. [www.minsaude.gov.cv](http://www.minsaude.gov.cv). (Acedido em 10 de abril de 2016)
- Mirante, C., Clemente, I. Zambu, G., Alexandre, C., Ganga, T., Mayer, C. & Brito, M. 2016. Comparing concentration methods: parasitrap® versus Kato-Katz for studying the prevalence of Helminths in Bengo province, Angola. *African Health Sciences* 16, 698-703.
- Moghaddam, D.D., Ghadirian, E. & Azami, M. 2005. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfa- methoxazole. *Parasitol. Res.*, 96, 273–5.
- Monis, P.T., Caccio, S.M. & Thompson, R.C.A. 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitology*, 25, 93-100.
- Morf, L. & Singh, U. 2012. *Entamoeba histolytica* a snapshot of current research and methods for genetic analysis. *Current Opinion Microbiology*, 15, 469-75.
- Morgan-Ryan, U.M., Fall A., Ward L.A., Hijjawi, N., Sulaiman, I., Fayer, R., Thompson, R.C., Olson, M., Lal, A. & Xiao L. 2002. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: cryptosporidiidae) from Homo sapiens. *Journal of eukaryotic Microbiology* 49, 433-40.
- Morgan, U.M. & Thompson, R.C. 1998. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? *Parasitology Today*, 14, 241-45.
- Morrison, H.G., MC Arthur, A.G., Gillin, F.D., Aley, S.B., Adam, R.D., Olsen, G.J., Best, A.A., Cande, W.Z., Chen, F., Cipriano, M.J., Davids, B.J., Dawson, S.C., Elmendorf, G., Nigam, A., Nixon, J.E, Palm, D., Passamaneck, N.E., Prabhu, A., Reich, C.I., Reiner, D.S., Samuelson, J., Svard, S.G. & Sogin, M.L. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science*, 317, 1921-6.
- Moura, H., Silva, J.L.N., Sodré, F.C., Brasil's, P., Wallmo, K., Wahlquist, S., Wallace, S., Croppo, G.P., & Visvesvafw, G.S. 1997. Gram-Chromotrope: a new technique that

enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43, 94S-95S.

Mukaratirwa, A., Berejena, P.C., Nziramasanga, A., Shonhai, T.S., Mamvura, P., Chibukira, I., Mucheuki, D., Mangwanya, M., Kamupota, P., Manangazira, C., Tapfumaneyi, R., Gerede, M., Munyoro, J.M., Mwenda, J.M., Mphahlele, M.L., Seheri, I., Peenze, A.N., Gonah, A., Maruta, M. & Tengende, B. 2014. Epidemiologic and genotypic characteristics of rotavirus strains detected in children less than 5 years of age with gastroenteritis treated at 3 pediatric hospitals in Zimbabwe during 2008-2011. *Pediatr Infect Dis J.*, 33, S45-8.

Müller, I., Yap, P., Steinmann, P., Damons, B.P., Schindler, C., Seelig, H., Htun, N.S.N., Probst-Hensch, N., Gerber, M., Randt, R., Pühse, U., Walter, C. & Utzinger, J. 2016. Intestinal parasites, growth and physical fitness of schoolchildren in poor neighbourhoods of Port Elizabeth, South Africa: a cross-sectional survey. *Parasites & Vectors*, 9, 1-13.

Mwenda, J.M., Ntoto, K.M., Abebe, A., Enweronu-Laryea, C., Amina, I., Mchomvu, J., Kisakye, A., Mpabalwani, E.M., Pazvakavambwa, I., Armah, G.E., Seheri, L.M., Kiulia, N.M., Page, N., Widdowson, M.A. & Steele, A.D. 2010. Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network. *J Infect Dis.*, 202, S5-S11.

Naish, S., McCarthyand, J. & Williams, G.M. 2004. Prevalence, intensity and risk factors for soil-transmitted helminthes infection in a South Indian fishing village. *Acta Tropica*, 91, 177-87.

Nascimento, W.R.C., Cavalcanti, I.M.F., Irmão, J.I. & Rocha, F.J.S. 2009. Presença de *Cryptosporidium* spp. em crianças com diarreia aguda em uma creche pública de Recife, Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42, 175-8.

Neto, A., Pereira, A., Alencar, M., Souza, P., Dias, R., Fonseca, J., Santos, C. & Almeida J. 2010. Prevalence of Intestinal Parasites versus Knowledge, attitude, and practices of inhabitants of low-income communities of Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasitology research*, 107, 295-307.

Neves, D.P., De Melo, A.L., Linardi, P. M. & Vitor, R. W. 2004. *Parasitologia Humana* 11ª edição. São Paulo: Editora Atthenue.

Neves, D.P., De Melo, A.L., Linardi, P. M. & Vitor, R.W. 2011. *Parasitologia humana*. 12ª edição., Rio de Janeiro: Editora Atheneu.

Newman, R.D., Sears, C.L., Moore, S.R. Nataro, J.M., Wuhib, T., Agnew, D.A., Guerrant, R.L. & Lima, A.M.A. Longitudinal Study of *Cryptosporidium* Infection in Children in Northeastern Brazil. *J Infect Dis.*, 180, 167-75.

Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Virginia, P., Edgcomb, P.D.V., Ho, L.C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M.L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L. & Eric Viscogliosi, E.

2005. "Molecular Phylogenies of *Blastocystis* Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species, and Zoonosis". *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 348–55.
- Nosala, C. & Dawson, S.C. 2016. The Critical Role of the Cytoskeleton in the Pathogenesis of *Giardia*. *Curr Clin Microbiol Rep.*, 2, 155–62.
- Norhayati, M., Fatmah, M., Yusof, S. & Edariah, A. 2003. Intestinal parasitic infections in man: a review. *The Medical Journal Malaysia*, 58, 296-305.
- Novak, P., Mastalka, K. & Loster, J. 2015. *Entamoeba Hystolytica*-Pathogenic protozoan of the Large Intestin in Humans. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 1, 10-17.
- Núñez, Gonzalez, O.M., Gonzalez, I. 2003. Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* em niños de guarderías infantiles de ciudad de La Habana, Cuba. *Caderno Saúde Pública*, 19, 677-82.
- Nyarango, R.M., Alo, P.A., Kabiru, E.W. & Nyanchongi, B.O. 2008. The risk of pathogenic intestinal parasite infections in Kisii Municipality, Kenya. *BMC Public Health*, 8, 1-6.
- O'Connell E.M. & Nutman, T.B. 2016. Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 95, 508–13.
- Odiit, A., Mulindwa, A., Nalumansi, E., Mphahlele, M.J., Seheri, L.M., Mwenda, J.M. & Kisakye, A. 2014. Rotavirus prevalence and genotypes among children younger than 5 years with acute diarrhea at Mulago National Referral Hospital, Kampala, Uganda. *Pediatr Infect Dis J.*, 33, S41-4.
- O'Donoghue, P. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25, 139-95.
- O'Hara, S.P. & Chen, X.M. 2011. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes and Infection*, 13, 721-30.
- Ok, U. Z., Cirit, M., Uner, A. E., Ok, A.E., Akcicek, F., Basci, A. & Ozcel, M.A. 1997. Cryptosporidiosis and blastocystosis in renal transplant recipients. *Nephron*, 75, 171–74.
- Okyay, P., Ertug, S., Gultekin, B., Onen, O. & Beser, E. 2004. Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey. *BMC Public Health.*, 4.
- Oliveira, D., Ferreira, S.F., Atouguia, J., Fortes, F., Guerra, A. & Lima-Centeno, S. 2015. Infection by Intestinal Parasites, Stunting and Anemia in School-Aged Children from Southern Angola. *PLoS ONE* 10, 1-10.

- O’Lorcaín, P. & Holland, C.V. 2000. ‘The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology*, 121, 51-71.
- ONU, CABO VERDE. 2010. *Relatório sobre Objetivos de Desenvolvimento do Milênio 2010*. <http://www.un.cv>. (Acedido em 6 de Abril de 2016)
- ONU, CABO VERDE. 2010. Situação Geográfica de Cabo Verde, Historia, Economia, População. <http://www.un.cv/contactos.php>. (Acedido em 6 de Abril de 2016).
- Orenstein, J. M. 1991. Microsporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Parasitol.*, 77, 843-64.
- Orlandini, M.R. & Matsumoto, L.S. Prevalência de parasitoses intestinais em escolares. Universidade Estadual do Norte do Paraná, Campus Luiz Meneghel (UENP/CLM). Disponível em <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1655-8.pdf>>. (Acedido em 15 de Abril de 2017).
- Orlik, J., Bottcher, K., Gross, U. & Bohne, W. 2010. Germination of phagocytosed *E. cuniculi* spores does not significantly contribute to parasitohorous vacuole formation in J774 cells. *Parasitology Research*, 106, 753-5.
- Osman, M., Safadi, D.E, Benamrouz, S., Guyot, K. Eduardo Dei-Cas, E. El, M.A., Colette, C., Hassan, M., Monzer, H., Fouad, D., Eric, V. & Gabriela, C. 2015. Initial Data on the Molecular Epidemiology of Cryptosporidiosis in Lebanon, *PLOS ONE*, 10, 1-8.
- Osman, M., Dima El Safadi, D.E., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., Pereira, B., Razakandrainibe, R., Pinon, A., Lambert, C., Wawrzyniak, I., Dabboussi, F., Delbac, F., Favennec, L., Monzer Hamze, M., Viscogliosi, E. & Certad, G. 2016. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, 1-17.
- Outtara M., Silué, K.D., N’Guessan K., Yapi, A., Barabara, M., Raso, G., Utzinger, J. & N’Goran E. 2008. Prévalence et polyparasitisme des protozoaires intestinaux et répartition spatiale d’*Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* et *Giardia intestinalis* chez des élèves en zone rurale de la région de Man en Côte-d’Ivoire. *Cahiers Santé*, 18, 215-22.
- Painter, J.E., Hlavsa, M.C., Collier, S.A., Xiao, L. & Yoder, J.S. 2015. Cryptosporidiosis Surveillance — *United States*, 2011–2012, *MMWR*, 64,1-13.
- Parashar, U.D., Gibson, C.J., Bresee, J.S. & Glass, R.I. 2006. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.*, 12, 304-6.
- Parashar, U., Steele, D., Neuzil, K., Quadros, C., Tharmaphornpilas, P., Serhan, F. Santosham, M. Patel, M. & Roger Glass, R. 2013. Progress with rotavirus vaccines: summary of the Tenth International Rotavirus Symposium. *Expert Reviews*. 12, 113-117.

- Pasqualotto A. & Schwarzbald A. 2006. Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artemed.
- Pasqui, A. L. Savini, E. Saletti, M. Guzzo, C. Puccetti, L. & Auteri, A. 2004. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 8:117–20.
- Paulo, R.L.P., Rodrigues, A.B.D., Machado, B.M. & Gilio, A.E. 2016. The impact of rotavirus vaccination on emergency department visits and hospital admissions for acute diarrhea in children under 5 years. *Rev Assoc Med Bras.*, 62, 506-12.
- Pesavento, J.B.S.E., Crawford, M.K., Estes, B.V. & Prasad, V. 2006. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 309, 189–219.
- Pezzani, C.B., Minvielle, M.C., Ciarmela, M.L., Apezteguía, M.C. & Basualdo, J. 2009. Participación en el control de las parasitosis intestinales en una localidad rural de Argentina. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 26, 471-77.
- Phommasack, B., Saklokhom, K., Chanthavisouk, C., Nakhonesid-Fish, V., Strandgaard, H., Montresor, A., Shuey, D.A. & Ehrenberg, J. 2008. Coverage and costs of a school deworming programme in 2007 targeting all primary schools in Lao PDR. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, 102, 1201-6.
- Plutzer, J. & Karanis, P. 2016. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Research*, 10, 1-69.
- Prado, M.S, Barreto, M.L, Strina, A., Faria, I.A., Nobre, A.A. & Jesus, S.R. 2001. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop.*, 34, 99-201.
- Puthia, M.K. Sio, S.W.S. Lu, J. & Kevin S. W. Tan, K.W.S. 2006. *Blastocystis ratti* Induces Contact-Independent Apoptosis, F-Actin Rearrangement, and Barrier Function Disruption in IEC-6 Cells. *Infection and Immunity*, 4114–23.
- Putignani, L. & Menichella, D. 2010. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives in Infectious diseases* 2010, 753512.
- Quihui-Cota, L. Lugo-Flores, C.M. Ponce-Martinez, J.A. & Morales-Figueroa, G.G. 2015. Cryptosporidiosis: a neglected infection and its association with nutritional status in schoolchildren in northwestern Mexico. *J Infect Dev Ctries.*, 9, 878-83.
- Rajurkar, M.N., Lall, N., Basak, S. & Mallick, S.K. 2012. A Simple Method for Demonstrating the *Giardia Lamblia* Trophozoite. *J Clin Diagn Res.*, 6, 1492-4.
- Ramirez, N.E. Ward, L. & Sreevatsan, S. 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection*, 6, 773-85.

- Rasmussen, G.H., Lund, M., Enemark, H.L., Erlandsen, M. & Petersen, E. 2016. Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84, 187-90.
- Rayan, H.Z., Ismail, O.A. & El Gayar, E.K. 2007. Prevalence and clinical features of *Dientamoeba fragilis* infections in patients suspected to have intestinal parasitic infection. *J Egypt Soc Parasitol.*, 37, 599– 608.
- Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Deworming for Health and Development Geneva, 29–30 November 2004. [www.worldcat.org/oclc/61404482](http://www.worldcat.org/oclc/61404482)
- Roberts, T. Stark, D. Harkness, J. Ellis, J. 2014. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6, 1-9.
- Rocha, R.S., Janaína Guernica Silva, J.G., Peixoto, S.V., Caldeira, R.L., Firmo, J.O.A., Carvalho, O.S. & Katz, N. 2000. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais em crianças do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 3, 431-6.
- Rop, D.C., Nyanchongi, B.O., Nyanger, J. & Orucho, V.O. 2016. Risk factors associated with intestinal parasitic infections among inmates of Kisii prison, Kisii county, Kenya *BMC Research Notes*, 9, 1-10.
- Rosales, M.J., Córdón, G.P., Moreno, M.S. & Sánchez, C.M. 2005. Extracellular like-gregarine stages of *Cryptosporidium parvum*. *Acta Tropica*, 95, 74-8.
- Ross, A.G.P., Olveda, M.R., McManus, D.P., Harn, D.A., Chy, D., Li, Y., Tallo, V. & Ng. S. 2016. Risk factors for human helminthiasis in rural Philippines, *International Journal of Infectious Diseases*, 1-6.
- Ruiz, M.C., Leon, T., Diaz, Y. & Michelangeli, F. 2009. «Molecular biology of rotavirus entry and replication». *TheScientificWorldJournal*. 9, 1476–97.
- Saeed, A., Abd, H., Sandstorm, G. 2015. Microbial etiology of acute diarrhoea in children under five years of age in Khartoum, Sudan, *Journal of medical microbiology*, 64, 432– 37.
- Safadi, D.E., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A.P., Bottere, F., Candolfi, E., Desoubreux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P. & Viscogliosi, E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France, *BMC Infectious Diseases*, 16, 1-11.
- Safadi D.E., Gaayeb, L., Meloni D., Cian A., Poirier. P, Wawrzyniak I., Delbac F., Dabboussi F., Delhaes L., Seck M., Hamze M., Riveau G. & Viscogliosi E. 2014.

Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infect Dis.* 14, 164.

Salvador, F., Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Alonso, C., Santos, J., Fuentes, I. & Molina, I. 2016. Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. infection in Barcelona, Spain, *Parasites & Vectors* 9, 1-7.

Santana, L. A. *et al.*, 2014. Atualidades sobre giardíase. *Jornal Brasileiro de Medicina Brasil*, 102, 7-10.

Santín, M., Trout, J.M. & Fayer, R. 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Veterinary Parasitology*, 155, 15-23.

Santos, H.L.C., Bandyopadhyay, K. & Bandea, R., Peralta, R.H.S. 2013. LUMINEX: a new technology for the simultaneous identification of five *Entamoeba* spp. commonly found in human's stools, *Parasites & Vectors*, 6, 1-9.

Santos, J., Duarte, A.R.M., Gadotti, G. & Lima, L.M. 2014. Parasitoses intestinais em crianças de creche comunitária em Florianópolis, SC, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 43, 332-40.

Santos, L.U., Bonatti, T.R., Neto, R.C. & Franco, R.M.B. 2004. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in activated sludge samples in Campinas, SP, Brasil. *Revista Instituto Medicina Tropical, São Paulo*, 46, 309-13.

Santos, M., Cano, M., Nascif Júnior, I. & Zaiden, M. 2008. Epidemiologia das parasitoses intestinais em crianças de creches de Rio Verde- GO. Rio Verde: *Medicina, Ribeirão Preto*, 41, 182-7.

Sarfati, C., Bourgeois, A., Menotti, J., Liegeois, F., Moyou-Somo, R., Delaporte, E., Derouin, F., Ngole, E.M. & Molina, J.M. 2006. Prevalence of intestinal parasites including microsporidia in human immunodeficiency virus-infected adults in Cameroon: a cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg.*, 74, 162-4.

Sargeant, P.G. & Williams, J.E. 1978. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72, 164-6.

Sateriale, A. & Huston, C. 2011. A sequential model of Host cell killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. *Journal of Parasitology Research*, 10 pgs.

Satheeshkumar, S., Ananthan, S. & Joyee, A. G. 2005. Detection of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) by polymerase chain reaction (PCR) using species-specific primer in stool samples of hiv patients. *Indian J.Med.Res.*, 121, 215-19.

Scanlan, P.D., Stensvold, C.R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H.G., De Vos, W.M., O'Toole, P.W. & Cotter, P.D. 2014. The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 90. 326-30.



- Schuurman, T., Lankamp, P., van Belkum, A., Kooistra-Smid, M. & van Zwet, A. 2007. Comparison of microscopy, real-time PCR and a rapid immunoassay for the detection of *Giardia lamblia* in human stool specimens. *Clin Microbiol Infect.*, 13, 1186-91.
- Seixas, M.T.L., Souza, J.N., Souza, R.P., Teixeira, M.C.A. & Soares, N.M. 2011. Avaliação da frequência de parasitos intestinais e do estado nutricional em escolares de uma área periurbana de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 40, 304-14.
- Sekar, U. & Shanthi, M. 2013. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol.*, 3, 35-9.
- Shaikh G.S., Begum R., Hussain A. & Sahaikh R. 2009. Prevalence of intestinal protozoan and helminth parasites in Sukkur, Sindh. Sindh University Research. *Journal*, 41, 53-8.
- Shalaby, N.M. & Shalaby, N.M. 2016. Effect of *Ascaris lumbricoides* infection on T helper cell type 2 in rural egyptian children. *Therapeutics and Clinical Risk Management* (12) 379–385.
- Sharbatkhori, M., Nazemalhosseini-Mojarad, E., Cheraghali, F., Maghsoodloorad, F.S., Taherkhani, H. & Vakili, M. 2014. Discrimination of *Entamoeba* Spp. in children with dysentery. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench. Summer*, 7, 164–7.
- Shimelis, T., Tassachew, Y. & Lambiyo, T. 2016. *Cryptosporidium* and other intestinal parasitic infections among HIV patients in southern Ethiopia: significance of improved HIV-related care. *Parasites & Vectors*, 9, 1-7.
- Silva, C.G. & Santos, H.A. 2001. Ocorrência de parasitoses intestinais da área de abrangência do Centro de Saúde Cícero Idelfonso da Regional Oeste da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Biol Cienc Terra*, 1, 519-22.
- Silva, E.F., Silva, V.B.C., & Freitas, F.L.C. 2012. Parasitoses Intestinais em Crianças Residentes na Comunidade Ribeirinha de São Francisco do Laranjal, Município de Coari, Estado do Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 41,97-101.
- Silva, F.S., Paulo, A.D.C., Braga, C.M.M., Almeida, R.J. & Galvão, V.P. 2010. Frequência de Parasitos Intestinais no Município de Chapadinha, Maranhão, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 39, 63-8.
- Silva, S., Silva, S.P., Gouveia, Y.S., Silva, N.O., Melo, M.E.R.M., Moura, H., Neves, R.H., Bello, A.R. & Machado-Silva, J.R. 2003. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de crianças, menores de 10 anos de idade, com indicação clínica de Rotavírus. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 421-3.
- Singh, M., Suresh, K. Ho, L.C., Ng, G.C. & Yap. E.H. 1995. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan. *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.*, 81, 446–50

- Slifko, T.R., Smith, H.V. & Rose, J.B. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30, 1379-93.
- Smith, H. & Nichols, R. 2007. *Cryptosporidium*. In SIMJEE, S. (ed.). Infectious Disease: Foodborne Diseases. Totowa: *Human Press Inc.*, 233-76.
- Smith, H.V., Nichols, R.A. & Grimason, A.M. 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 21, 133-42.
- Smith, H.V. & Rose, J.B. 1998. Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitol Today.*, 14, 14-22.
- Snelling, W.J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G. Lowery, C.J., Moore, J.E., Rao, J.R., Smyth, S., Millar, B.C., Rooney, P.J., Matsuda, M., Kenny, F., Xu, J. & Dooley, J.S. 2007. Cryptosporidiosis in developing countries. *Journal of infection in Developing Countries* 1, 242-56.
- Speich, B., Croll, D., Fürst, T., Utzinger, J. & Keiser, J. 2016. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect Dis.*, 16, 87–99.
- Sodré, F.C., Borges, A.L.V., Brasil, P. 1995. Descrição de um método modificado para concentração de esporos nas fezes para o diagnóstico das microsporidioses intestinais. *Jornal Brasileiro de Patologia* 31, 126-33.
- Southern, T.R., Jolly, C.E. Lester, M.E. & Hayman, J.R. 2007. EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere and infect hosts cells *in vitro*. *Eukaryotic Cell* 6, 1354-64.
- Souza, G.S.M.B. Rodrigues, L.A. Oliveira, W.J. Chernicharo, C.A.L. Guimarães, M.P. Massara, C.L. & Grossi, P.A. 2011. Desinfection of domestic effluents by gamma radiation: Effects on the inactivation of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Water research*, 45 5523-8.
- Stanley, S.L. 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361, 1025-34.
- Steenhard, N. R., Jungersen, G., Kokotovic, B., Beshah, E., Dawson, H.D., Urban, J.F.Jr., Roepstorff, A. & Thamsborg, S.M. 2009. *Ascaris suum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. *Vaccine*, 27, 5161-9.
- Stentiford, G. D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troeme, E.R., Roese, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F. & Solter, L. 2016. Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol*, 32, 336–48.
- Stenzel, D. J. & Boreham, P.F. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9, 563-84.

- Strong, W.B., Gut, J. & Nelson, R.G. 2000. Cloning and sequence analysis of a highly polymorphic *Cryptosporidium parvum* gene encoding a 60-Kilodalton glycoprotein and characterization of its 15- and 45-Kilodalton zoite surface antigen products. *Infection and Immunity*, 68, 4117-134.
- Sunnotel, O., Lowery, C., Moore, J., Dooley, J., Xiao, L., Millar, B., Rooney, P.J. & Snelling, W.J. 2006. Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 7-16.
- Supali T, Verweij JJ., Wiria AE., Djuardi Y, Hamid F, Kaisar, M.M., Wammes, L.J., Van Lieshout, L., Luty, A. J., Sartono, E. & Yazdanbakhsh, M. 2010. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int J Parasitol*, 40, 1171-76.
- Squire, S.A., & Ryan, U. 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors*, 10, 1-32.
- Tan, K. S.W. 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology* 126, 121-44.
- Tan, K.S.W. 2008. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 639-65.
- Tanyuksel, M. & Petri, W.A. 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16, 713-29.
- Tashima, N.T., Simões, M.J.S., Leite, C.Q.F., Flumihan, A, Nogueira, M.A. & Malaspina, A.C. 2009. Classic and molecular study of *giardia duodenalis* in children from a daycare center in the region of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*, 51, 19-24.
- Tate, J.E, Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J. & Parashar, U.D. 2012. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 12, 136 – 41.
- Tavira, L.T. 2008. Módulo: Patologia Tropical. Suporte teórico: Patologia\_tropical.pdf. I Mestrado em Saúde Tropical. Universidade Nova de Lisboa. *Instituto de Higiene e Medicina Tropical*.
- Tetley, L., Brown, S.M., McDonald, V. & Coombs, G.H. 1998. Ultrastructural analysis of the sporozoite of *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology*, 144, 3249-55.
- Thea K., Fischer, T.K. & Gentsch, J.R. 2004. Rotavirus typing methods and algorithms *Rev. Med. Virol.* 14, 71-82.
- Thompson, R.C.A. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitol.*, 126, 15-35.

- Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Homan, W.L. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, 16, 210-13.
- Tompson, R.C.A. 2015. Neglected zoonotic helminths: *Hymenolepis nana*, *Echinococcus canadensis* and *Ancylostoma ceylanicum*, *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 426-32.
- Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M. & Lucocq, J.M. 2003. *Nature*, 13, 172-6.
- Trask, S.D., McDonald, S.M. & Patton, J.T. 2012. Structural Insights into the Coupling of Virion Assembly and Rotavirus Replication. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 165–77.
- Tumwine, J.K., Kekitiinwa, A., Bakeera-Kitaka, S., Ndeezi, G., Downing, R., Feng, X., Akiyoshi, D.E. & Tzipori, S. 2005. Cryptosporidiosis and microsporidiosis in ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Trop Med Hyg.*, 73,921-5.
- Tzipori, S. & Griffiths, J.K. 1998. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. *Advances in Parasitology* 40, 5-36.
- Tzipori, S. & Ward, H. 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4, 1047-58.
- Uchôa, C., Albuquerque, M., Carvalho, F., Falcão, A., Silva, P. & Bastos, O. 2009. Parasitismo intestinal em crianças e funcionários de creches comunitárias na cidade de Niterói-Brasil. *Niterói*, 38, 267-78.
- UNICEFCV. 2013. Statistics of Cabo Verde. [https://www.unicef.org/infobycountry/capeverde\\_statistics.html](https://www.unicef.org/infobycountry/capeverde_statistics.html) (Acedido em 6 Abril de 2016).
- UNICEF 2016 STATE OF WORLD'S CHILDREN  
[https://www.unicef.org/publications/files/UNICEF\\_SOWC\\_2016.pdf](https://www.unicef.org/publications/files/UNICEF_SOWC_2016.pdf)
- Verrest, L. & Dorlo, T.P.C. 2016. Lack of Clinical Pharmacokinetic Studies to Optimize the Treatment of Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. *Clinical Pharmacokinetics*, 1-24.
- Verweij, J., Blangé, R., Templeton, K., Schinkel, J., Brienens, E.A.T., Rooyen, M. A.A.V. & Polderman, A.M. 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. Netherlands: *J Clin Microbiol.*, 42, 1220-3.
- Vieira, A., Fernandes, A., Antunes, A. & Pina, A. 2010. Qualidade Microbiológica da Água Destinada ao Consumo Humano na Cidade da Praia. Praia.

- Virella, G. 2000. Microbiology and infectious diseases. *Urban & Partner Wroclaw*, 415-18.
- Waldron, L.S. & Power, M.L. 2011. Fluorescence analysis detects gp60 subtype diversity in *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1388-95.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Meloni, D., Texier, C., Delbac, F. & El Alaoui, H. 2013. *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis.*, 1, 167-78.
- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. & Owen R.L. 1994. Human microsporidial infections. *Clinical microbiology Reviews*, 7, 426-61.
- Weber, R., Ledergerber, B., Zbinden, M., Altwegg, M., Pfyffer, G. E., pycher, M. A., riner, J., Aiser, L., pravil, M., Meyenberger, C. & Flepp, M. 1999a. Enteric infections and diarrhea in human immunodeficiency virus-infected persons: prospective community-based cohort study. *Arch.Intern.Med.*, 159, 1473-80.
- Weber, R., Schwartz, D.A. & Deplazes, P. 1999b. Laboratory diagnosis of microsporidiosis. In M. Wittner & L. M. Weiss (Eds) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 315-62.
- WHO, World Health Organization. 2016. Neglected tropical diseases [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/). Acedido a 28 de Março de 2016.
- WHO. 2016. (ASCARIS) [www.who.int/intestinal\\_worms/en/](http://www.who.int/intestinal_worms/en/). (Acedido a 20 julho de 2016).
- WHO. 2005. Deworming for health and development. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Geneva, 1-64.
- Wielinga, P.R., De Vries, A., Van Der Goot, T.H., Mank, T. Mars, M.H., Kortbeek, L.M. & Van Der Giessen, J.W. 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *International Journal for Parasitology*, 38, 809-817.
- Wilson, W. & Sande, M. 2004. Doenças Infeciosas – Diagnóstico e Tratamento. Artmed. Porto Alegre.
- Wumba, R., Longo-Mbenza, B., Mandina, M., Odio, W.T., Biligui, S., Sala, J., Breton, J. & Thellier, M. 2010. Intestinal parasites infections in hospitalized AIDS patients in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Parasite*, 17, 321-8.
- Xavier, V., Domingues, B. & Marcos, T. 2012. Desparasitação intestinal sistemática em idade pediátrica: uma revisão baseada na evidência. *Rev Port Med Geral Fam* 28,178-86.
- Xiao, L. 2009. Overview of *Cryptosporidium* presentations at the 10th international workshops on opportunistic protists. *Eukaryotic Cell*, 8, 429-36.

- Xiao, L. 2010. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* 124, 80-9.
- Xiao, L., Alderisio, K., Limor, J. Royer, M. & Lal, A.A. 2000b. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5492-8.
- Xiao, L., Escalante, L., Yang, C., Sulaiman, I., Escalante, A.A., Montali, R.J., Fayer, R. & Lal, A.A. 1999<sup>a</sup>. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1578-83.
- Xiao, L., Bern, C., Sulaiman, I.M. & Lal, A.A. 2004a. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. In: Thompson, R.C.A., Armson, A., Ryan, U.M. (Eds.), *Cryptosporidium: From Molecules to Disease*. Elsevier, Amsterdam, 121–46.
- Xiao, L. & Cama, V. 2006. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In Ortega, Y. (ed.). *Foodborne Parasites: Food Microbiology and Food Safety, Griffin*, 57- 108.
- Xiao, L. Escalante, L. Yang, C. Sulaiman, I. Escalante, A.A. Montali, R.J. Fayer, R. & Lal, A.A. 1999a. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1578-83
- Xiao, L. Fayer, R., Ryan, U. & Upton, S.J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 72-97.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R. & Lal, A.A. 1999b. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3386-91.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Fayer, R., Thompson, R.C.A. & Lal, A.A. 2000. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitology Today*, 16, 287-92.
- Xiao, L. & Ryan, U.M. 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinions in Infectious Diseases*, 17, 483–90.
- Xiao, L. & Ryan, U.M. 2008. Molecular epidemiology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *CRC Press and IWA Publishing, Boca Raton, FL*, 119–71.
- Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R. & Lal, A.A. 2002. Host adaptation and host–parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology*, 32, 1773-85.

- Yoder, J.S. & Beach, M.J. 2010. *Cryptosporidium* surveillance and risk factors in the United States. *Experimental Parasitology*, 124, 31-9.
- Yoder, J.S., Wallace, R.M., Collier, S.A., Beach, M.J. & Hlavsa, M.C. 2012. Cryptosporidiosis surveillance— United States, 2009–2010. *MMWR Surveill Summ*, 61, 1–12.
- Yulfi, H., Darlan, D.M., Wandra, T., Purba, I.E., Purba, Y., Saragih, J.M. & Ito, A. 2016. Intestinal Protozoa Infections and Associated Risk Factors in Rural Community of Samosir Island Indonesia. *Advances in Health Sciences Research*, 1, 102-7.
- Zaman, V. Howe, J. & Ng. M. 1995. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res.*, 81, 465–69.
- Zhang, X., Cong, W., Lou, Z., Ma, J., Zheng, W., Yao, Q., Quan Zhao, Q. & Zhu, X. 2016. Prevalence, risk factors and multilocus genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* in farmed foxes (*Vulpes lagopus*), Northern China, *Parasites & Vectors* 9, 1-7.
- Zierdt, C.H. 1991. *Blastocystis hominis*—past and future. *Clin. Microbiol., Rev.* 4, 61–79.



## 6. Anexos

### Anexo A

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**CRIANÇAS (de 0 a 10 anos)**

**Título da pesquisa:** Monitorização da Ocorrência de Parasitas Intestinais numa População Hospitalar de Crianças (0-10 anos), na Ilha de Santiago, Cabo-Verde

**Investigadora participante:** Livonilda da Luz Lopes Gomes

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participação do meu (minha) filho (filha) como voluntário (a) do projeto de investigação supra-citado, sob a responsabilidade da Investigadora Olga Matos (Portugal) e da co-investigadora Livonilda da Luz Lopes Gomes, Licenciada em Bioquímica Cabo-verdiana, e mestranda do curso de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal (IHMT-UNL).

Assinado este Termo de Consentimento estou ciente de que:

- O objetivo da investigação visa:** verificar a prevalência de parasitoses intestinais em crianças seguidas no Hospital Agostinho Neto e analisar a diversidade genética dos parasitas identificados.
- Durante o estudo realizar-se-á:**
  - 2.1 Colheita de 1 a 2 amostras de fezes,** obtidas em dias alternados, armazenadas em frasco apropriado fornecido pela investigadora;
  - Obtive todas as informações necessárias para poder decidir consentimento sobre a participação do(a) meu (minha) filho (filha) no referido estudo;
  - Estou livre para interromper a qualquer momento a participação do meu (minha) filho (a) no estudo, a não ser que esta interrupção seja contra-indicada por motivo médico;
  - Os dados pessoais do meu(minha) filho(a) serão mantidos em sigilo e os resultados gerais obtidos através deste estudo serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada;
  - Em caso de dúvidas ou esclarecimentos, poderei entrar em contacto com a investigadora Livonilda da Luz Lopes Gomes, Telefone: \_\_\_\_\_;
  - Não existirão despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação do(a) meu(minha) filho(a).

Cidade da Praia, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pai ou mãe ou responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura da investigadora

Nome da criança: \_\_\_\_\_



## Anexo B

UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

INSTITUTO DE HIGIENE E  
**MEDICINA TROPICAL**  
DESDE 1902

**Monitorização da Ocorrência de Parasitas Intestinais numa População  
Hospitalar de Crianças (0-10 anos), na Ilha de Santiago, Cabo-Verde**

Número: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dia mês ano

Nome: \_\_\_\_\_

Sexo: M ☐ F ☐

Naturalidade: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Peso para a idade: < 60%

60 – 74,9%

Imunossupressão: • Sim ☐

• Não ☐

≥ 75%

Altura para a idade: < 85%

Médico Assistente: \_\_\_\_\_

85 – 89,9%

90 – 94,9%

Nº Processo: \_\_\_\_\_

≥ 95%

**PRESENÇA DE SINTOMAS**

Sem sintomas: Sim ☐ Não ☐

Febre: Sim ☐

Diarreia: Sim ☐

Dores abdominais.: Sim ☐

Não ☐

Não ☐

Não ☐

Vómitos: Sim ☐

Dores de cabeça: Sim ☐

Não ☐

Não ☐

Já teve diarreia alguma vez? \_\_\_\_\_ Quando? \_\_\_\_\_

Fez tratamento com anti-parasitário? \_\_\_\_\_

1ª Colheita de fezes (data) \_\_\_\_\_ 2ª Colheita de fezes (data) \_\_\_\_\_

### INFORMAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Encarregado de Educação: Mãe \_\_\_\_\_ Pai \_\_\_\_\_ Outro \_\_\_\_\_

Grau de escolaridade do Encarregado de Educação \_\_\_\_\_

Tipo de casa: Térrea \_\_\_\_\_ Apartamento \_\_\_\_\_

Qual o tipo de abastecimento de água na residência?

Canalizada: Sim ☐

Não ☐

Poço: Sim ☐

Não ☐

Qual o destino do esgoto?

Rede de esgoto: Sim ☐

Não ☐

Céu-aberto: Sim ☐

Não ☐

Fossa: Sim ☐

Não ☐

Colheita de lixo: Sim ☐ Não ☐

Hábitos de defecação da criança - nas proximidades da casa ☐

- na casa de banho ☐

- lava as mãos após ir à casa de banho? \_\_\_\_\_

Tem animais domésticos em casa? \_\_\_\_\_ Quais? \_\_\_\_\_

Há roedores junto à casa? Sim ☐ Não ☐

Conservação dos alimentos - em frigorífico: Sim ☐ Não ☐

## Anexo C



## COMITÉ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA PARA A SAÚDE

(CNEPS)

## Deliberação nº 64/2015

1-Foi submetido, nos termos do artigo 5º do Decreto-Lei nº 26/2007, de 30 de Julho, para apreciação do Comité Nacional de Ética em Pesquisa para a Saúde (CNEPS), o projecto de pesquisa intitulado: *"Monitorização da Ocorrência de Parasitas Intestinais numa população hospitalar de crianças (0-10anos), na Ilha de Santiago, Cabo-Verde"* pela Professora Olga Matos, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa.

2- O projecto enquadra-se numa tese de Mestrado de Livonilda da Luz Lopes Gomes, bioquímica cabo-verdiana que está a fazer o mestrado em Parasitologia Médica, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação da Professora Olga Matos.MD, com a colaboração do Hospital Dr. Agostinho Neto (HAN) na Praia, envolvendo os serviços de Pediatria e o Laboratório.

3- O CNEPS fez a análise documental e técnica da proposta na sua 57.ª Reunião Ordinária, realizada a 24 de Setembro de 2015, nomeadamente:

- Carta de submissão do projecto ao parecer do CNEPS
- Projecto de Pesquisa
- O Modelo da Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido
- O curriculum vitae da Coordenadora do Estudo
- O Curriculum vitae da Mestranda
- E-mails comprovativos dos contactos com a Direcção Clínica do Hospital, os (as) médicos (as) da Pediatria e as técnicas do laboratório do HAN.

4-O CNEPS delibera no sentido da aprovação do projecto de investigação, por cumprir todos os requisitos éticos, ao abrigo do artigo nº11 do decreto-lei nº26/2007,devendo as investigadoras manter o CNEPS informado do andamento dos trabalhos e dos resultados alcançados.

Praia,25 de Setembro de 2015

A Presidente do CNEPS  
 Maria da Conceição Moreira de Carvalho



## Anexo D

### **Método de sedimentação difásica de Ritchie (modificado e adaptado por Casemore *et al.*, 1985).**

As amostras fecais foram concentradas por este método de acordo com o seguinte protocolo:

Num tubo de centrífuga de 15 ml, homogeneizou-se cerca de 0,5 ml ou o equivalente de amostra sólida, em 3 ml de água destilada, ao qual se adicionaram 2 ml de éter (Merck, Alemanha). A solução obtida foi agitada no vortéx cerca de 40 segundos, e de seguida, num novo tubo, devidamente identificado, filtrou-se com o auxílio de gaze e de um funil. Posteriormente foi adicionada água destilada até perfazer o volume total do tubo e efetuou-se a primeira centrifugação (Neraeus Labofuge 400), durante 5 minutos, a 1500 rpm. Após a centrifugação, utilizando uma pipeta de Pauster descartou-se o anel de gordura que se formou à superfície, devido à emulsão de lípidos e outros detritos, após a adição do éter. O sobrenadante foi removido para um novo tubo de centrífuga de 15 ml, e perpez-se o volume com água destilada, seguindo-se uma segunda centrifugação durante 10 min, a 4500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o segundo sedimento foi conservado num eppendorf de 2 ml, a 4°C, assim como o primeiro sedimento, para a posterior análise parasitológica e molecular.



## Anexo E

### Coloração de Ziehl-Neelsen Modificada (adaptado de Casemore *et al.*, 1985)

As amostras de fezes sugestivas de uma eventual presença de oocistos de *Cryptosporidium* spp., por exame direto e/ou por sintomas referidos no questionário, foram analisadas através do método de Ziehl-Neelsen modificado (adaptado de Casemore *et al.*, 1985). Foi feito um esfregaço de cada amostra de fezes com o segundo sedimento, obtido em 2.6.2.1, e procedeu-se à sua coloração. Depois de bem secos, os esfregaços fecais foram fixados em metanol (Panreac Química S.A.U., Espanha) durante um minuto. As lâminas foram de seguida, mergulhadas em fucsina básica fenicada (Deltalab, Espanha) durante 10 minutos e seguidamente lavadas com água corrente e descoradas com álcool clorídrico a 1% em etanol absoluto [Panreac Química S.A.U., Espanha]; 1% ácido clorídrico [HCl, Sigma-Aldrich, EUA] até à eliminação total do corante em excesso. As lâminas foram novamente lavadas com água e de seguida mergulhadas em azul-de-metileno (Deltalab, Espanha) durante 30 segundos. Finalmente, passaram-se as lâminas por água, deixaram-se secar à temperatura ambiente e depois de se efetuar a sua montagem em meio entellan (Merck, Alemanha) foram observadas ao microscópio ótico para a deteção e identificação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., com recurso às objetivas de 20x e 40x.

## Anexo F

### **Método de extração de DNA através do protocolo comercial *QIAamp Fast DNA Stool Mini kit* (QIAGEN, Alemanha).**

O protocolo deste kit de extração consiste em quatro passos: lise celular, adsorção de DNA à membrana de sílica, lavagem e eluição de DNA purificado a partir da coluna.

**1- Lise celular:** por amostra, foram colocadas 400 µl de fezes concentradas pelo método (referido em 2.6.2.1) num tubo de micro-centrífuga de 2 ml e adicionaram-se 500 µl do tampão de lise InhibitEX. De seguida as amostras foram homogeneizadas continuamente no vórtex durante um minuto, de modo a assegurar a máxima concentração de DNA. O tampão InhibitEX remove os inibidores de PCR durante a extração do DNA, absorve substâncias que podem degradar o DNA e inibe reações enzimáticas. Posteriormente a suspensão foi aquecida durante 10 minutos a 70 °C e homogeneizada no vórtex durante 15 segundos. Seguiu-se uma centrifugação (centrífuga KUBOTA 3300) apenas de 1 minuto para sedimentar as partículas das fezes. Para novos tubos de centrífuga de 1,5 ml pipetaram-se 25 µl de Proteinase K (é uma serina protease capaz de hidrolisar uma variedade de ligações peptídicas), aos quais foram adicionados 600 µl de sobrenadante dos tubos iniciais. Depois foram adicionados 500 µl de tampão AL (contém sal caotrópico que aumenta os efeitos hidrofólicos dentro da solução), e procedeu-se à homogeneização no vórtex durante cerca de 15 segundos. Em seguida procedeu-se à incubação das amostras a 70°C, durante 15 minutos, e depois adicionaram-se 450 µl de etanol a 96% ao lisado, e foram homogeneizadas no vórtex.

**2- Adsorção de DNA:** de seguida, aplicaram-se 600 µl do lisado obtido no passo anterior, à coluna Qiamp (QIAGEN, Alemanha) que foi fechada e centrifugada durante um minuto. Após essa breve centrifugação o DNA é adsorvido na membrana de sílica da coluna. As concentrações de sal otimizadas e as condições de pH no lisado asseguram que os restos de proteínas digeridas, e outras impurezas que podem inibir a PCR, fiquem retidos na membrana. Em seguida a coluna foi colocada num novo tubo coletor e o tubo que continha o filtrado foi descartado (repetiu-se este passo até que todo o lisado tenha sido carregado na coluna).

**3- Lavagem:** as condições de lavagem otimizadas (utilizando dois tampões de lavagem) asseguram a remoção completa de todas as impurezas residuais sem afetar a ligação do DNA. A coluna foi cuidadosamente aberta e adicionaram-se 500 µl de tampão AW1 (contém uma concentração baixa de guanidina) e em seguida centrifugou-se durante um minuto. Após a centrifugação a coluna foi colocada num novo tubo coletor, descartando o tubo que continha o filtrado anterior e adicionaram-se 500 µl de tampão AW2 (utilizado para remover sais). De seguida procedeu-se a uma segunda centrifugação durante três minutos. O tubo que continha o filtrado foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo coletor que foi centrifugado durante três minutos. Este passo serve para eliminar resíduos do tampão AW2 que possam ter ficado retidos na membrana da coluna.

**4- Eluição de DNA:** para eluir o DNA purificado e concentrado, a coluna foi transferida para um eppendorf de 1,5 ml e pipetaram-se 80 µl de tampão ATE diretamente sobre a membrana. O tampão ATE é um tampão de eluição, com baixos níveis de EDTA (ácido etilenodiamina tetra-acético), otimizado para armazenamento de DNA a longo prazo. Em seguida, os eppendorfs foram incubados durante 5 min à temperatura ambiente, e centrifugados durante dois minutos.

## Anexo G

### Visualização dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação da segunda reação da *nested*-PCR, utilizados neste estudo, foram visualizados em gel de agarose a 1,5% de acordo com o seguinte procedimento:

Para a preparação do gel pesou-se (KERN Acj/Acs-320-4, Alemanha) 1,5 g de agarose pura (Citomed, Portugal), que foram dissolvidos em 100 ml de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA; pH 8.3) e ao qual se adicionou brometo de etídio na concentração final 0,5 µg/ml (Sigma, EUA). Após polimerização, o gel foi colocado numa tina de eletroforese (Bio-Rad, Portugal) com tampão TAE 1X. Posteriormente em tubos de micro-centrífuga adicionou-se 1,5 µl de 6 × *DNA loading dye* (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido) e mais 16 µl de produto de PCR. A migração dos produtos de PCR no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 100 quilobase (kb) (*G. duodenalis* e *E. bienersi*) e de 1 kb (*Cryptosporidium* spp.), tendo-se adicionado a 1,5 µl de 6 × *DNA loading dye* (Fermentas) 1,0 µl de marcador e 15 µl de água desionizada estéril. Depois da aplicação dos produtos de PCR e do marcador submeteu-se o gel a uma corrente elétrica de 100 volts durante cerca de 40 minutos.

A visualização, dos produtos de amplificação no gel, efetuou-se sob a iluminação ultravioleta (UV), no transiluminador (Vilber Lourmat, França), devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA. Os géis foram seguidamente fotografados e as bandas de interesse excisadas do gel com a ajuda de um bisturi e conservados em microtubos a 4°C.



## Anexo H

### Purificação de fragmentos de DNA amplificados por *kit comercial “JecQUICK Purification Spin”* (Genomed).

**1ª Fase: Solubilização da agarose:** cortaram-se, cuidadosamente, as zonas do gel de agarose onde se encontra as bandas correspondentes, com as dimensões pretendidas, excluindo as moléculas de tamanho indesejado, o que permite, desde logo, a eliminação de dímeros de primers e de outros produtos inespecíficos. Num tubo de *eppendorf* de 1,5 ml, foram colocadas as bandas. Por cada 100 mg de agarose, adicionaram-se 250 µl da solução L1. Seguiu-se a incubação da solução a 50 °C durante 30 minutos, agitando-se vigorosamente no vortex em intervalos de 10 minutos. A solução L1 contém perclorato de sódio (NaClO<sub>4</sub>), um agente que, quando utilizado em elevadas concentrações, remove complexos proteicos presentes em solução, acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), cuja ação visa precipitar os ácidos nucleicos em solução, e Tris-Borato-EDTA (TBE), um tampão que, em conjunto com o aumento da temperatura, auxilia na solubilização da agarose.

**2ª Fase: Aplicação em coluna e adsorção de DNA:** colocaram-se as colunas JetQUICK em tubos coletores de 2 ml e transferiu-se 600 µl da mistura obtida no passo anterior. Seguiu-se uma centrifugação (centrifuga KUBOTA 3300) a 12500 rpm durante 1 minuto, da qual se descartou o filtrado. Adicionou-se às colunas 250 µl da solução L1 e aguardou-se um minuto. De seguida, procedeu-se a uma nova centrifugação a 12500 rpm durante 1 minuto e descartou-se o filtrado. As colunas possuem uma matriz de sílica, que é um material com alta afinidade para as moléculas de DNA, carregadas negativamente.

**3ª Fase: Lavagem da coluna:** esta fase tem como objetivo remover contaminantes. Colocou-se a coluna num novo tubo coletor de 2 ml onde adicionou-se 250 µl de solução H2 e aguardaram-se 5 minutos. A solução de H2 é composta por EDTA, um forte agente quelante, aplicado para aprisionar iões monovalentes, Tris-HCl, um tampão que auxilia na manutenção do pH, funcionando como agente estabilizador da solução, etanol, que funciona como um forte solvente orgânico, e cloreto de sódio, utilizado para manter e estabilizar as cargas iónicas. Posteriormente, centrifugou-se a 1250 rpm durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado e colocou-se a coluna novamente no tubo coletor. Repetiu-se a centrifugação por 2 minutos e descartou-se o tubo com o filtrado final. Esta segunda

centrifugação tem por objetivo remover a totalidade do etanol, composto orgânico considerado como um contaminante limitante da reação de sequenciação.

**4<sup>a</sup> Fase: Eluição de DNA:** colocaram-se as colunas num eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 50 µl de TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0; tris = hidroximetilaminometano), pré-aquecida a 65°C, diretamente no centro da matriz de sílica de forma a ter uma distribuição uniforme e a solver o máximo de moléculas de DNA. Aguardaram-se 5 minutos e seguiu-se uma centrifugação final a 12500 rpm durante dois minutos. Por fim, o filtrado com DNA purificado foi guardado a -20°C e a coluna utilizada foi descartada.

## Anexo I

### **Teste rápido *Rota-Strip* (CORIS BioConcept) para deteção de rotavírus nas fezes, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.**

Procedimento:

Adicionaram-se 14 gotas de tampão de diluição em *eppendorf*. Ao *eppendorf* contendo tampão de diluição adicionaram-se 40 µl da amostra fecal concentrada (referido em 2.6.2.1) e no vórtex a preparação/mistura foi homogeneizada. Em seguida as tiras foram mergulhadas no *eppendorf* e deixou-se agir durante 10 minutos.

Os resultados devem ser interpretados da seguinte forma:

- ❖ Resultado negativo: uma banda avermelhada aparece na linha de controlo (C) (linha superior). Nenhuma outra banda está presente.
- ❖ Resultado positivo: Para além da banda avermelhada na linha de controlo (C), aparece uma linha avermelhada visível na posição da linha de teste (T). A intensidade da linha de teste pode variar de acordo com a quantidade de antigénios encontrados na amostra. Qualquer sinal, mesmo fraco, na linha de teste deve ser considerado como um resultado positivo. No entanto, o teste é qualitativo e não pode prever a quantidade de antigénios presentes na amostra.
- ❖ Resultado inválido: a ausência de banda na linha de controlo, que é a linha superior, torna o resultado inválido. Neste caso, a amostra deve ser novamente testada.

## Anexo J

**Medidas de localização e dispersão das variáveis idade e dias de entrega das fezes das crianças.**

	<b>Idade (anos)</b>	<b>Dias de entrega das fezes</b>
<b>N</b>	150	144
<b>Média</b>	4,53	2,58
<b>Mediana</b>	4,25	2,00
<b>SD</b>	3,13	1,40
<b>min.</b>	0,00	1,00
<b>max.</b>	10,00	11,00
<b>P<sub>25</sub></b>	1,92	2,00
<b>P<sub>75</sub></b>	7,25	3,00

SD= desvio padrão; Min.= mínimo; max.= máximo; P<sub>25</sub>=percentil 25; P<sub>75</sub>= percentil 75



## Anexo k

**Quadro 30:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica*/*E. dispar* e *E. bienersi* de acordo com os fatores clínicos.

Fatores clínicos		Espécies de protozoários intestinais												
		Infecção por <i>G. duodenalis</i>			Infecção por <i>Cryptosporidium</i> spp.			Infecção por <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>			Infecção por <i>E. bienersi</i>			
		Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*	Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*	Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*	Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*	
Imunossupressão	Não	132 (98,5)	16 (100,0)	1,000*	146 (98,6)	2 (10,0)	1,000*	144 (98,6)	4 (100,0)	1,000*	140 (98,6)	8 (100,0)	1,000*	
	Sim	2 (1,5)	0 (0,0)		2 (1,4)	0 (0,0)		2 (1,4)	0 (0,0)		2 (100,0)	0 (0,0)		
	Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)		
Sintomatologia	Febre	Não	114 (85,1)	14 (87,5)	1,000*	127 (85,8)	1(50,0)	0,273*	126 (86,3)	2 (50,0)	0,103*	121 (85,2)	7 (87,5)	1,000*
		Sim	20 (14,9)	2 (12,5)		21 (14,2)	1 (50,0)		20 (13,3)	2 (50,0)		21 (14,8)	1 (12,5)	
		Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)	
	Diarreia	Não	114 (85,1)	11 (68,8)	0,147*	123 (83,1)	2 (100,0)	1,000*	122 (83,6)	3 (75,0)	0,522*	119 (83,8)	6 (75,0)	0,625*
		Sim	20 (14,9)	5 (31,2)		25 (16,9)	0 (0,0)		24 (16,4)	1 (25,0)		23 (16,2)	2 (25,0)	
		Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)	
	Dores abdominais	Não	67 (50,0)	6 (37,5)	0,431**	72 (48,6)	1 (50,0)	1,000*	72 (49,3)	1 (25,0)	0,620*	68 (47,9)	5 (62,5)	0,486*
		Sim	67 (50,0)	10 (62,5)		76 (51,4)	1 (50,0)		74 (50,7)	3 (75,0)		74 (52,1)	3 (37,5)	
		Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)	
	Vômitos	Não	124 (92,5)	14 (87,5)	0,619*	136 (91,9)	2 (100,0)	1,000*	135 (92,5)	3 (75,0)	0,286*	130 (91,5)	8 (100,0)	1,000*
		Sim	10 (7,5)	2 (12,5)		12 (8,1)	0 (0,0)		11 (7,5)	1 (25,0)		12 (10,0)	0 (0,0)	
		Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)	
	Dor de cabeça	Não	93 (69,4)	10 (62,5)	0,777*	102 (68,9)	1 (50,0)	0,530*	101 (69,2)	2 (50,0)	0,590*	95 (66,9)	8 (100,0)	0,057*
		Sim	41 (30,6)	6 (37,5)		46 (31,1)	1 (50,0)		45 (30,8)	2 (50,0)		47 (33,1)	0 (0,0)	
		Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)	
Tratamento antiparasitário	Não	81 (60,4)	10 (62,5)	1,000**	89 (60,1)	2 (100,0)	0,520*	88 (60,3)	3 (75,0)	1,000*	87 (61,3)	4 (50,0)	0,712*	
	Sim	53 (39,6)	6 (37,5)		59 (39,9)	0 (0,0)		58 (39,7)	1 (25,0)		55 (38,7)	4 (50,0)		
	Total	134 (100,0)	16 (100,0)		148 (100,0)	2 (100,0)		146 (100,0)	4 (100,0)		142 (100,0)	8 (100,0)		

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.

**Quadro 31:** Distribuição das crianças com e sem infecção por *B. hominis* de acordo com os fatores clínicos.

Fatores Clínicos		Infecção só por <i>B. hominis</i>		
		Ausência n (%)	Presença n (%)	Sig. P*
<b>Imunossupressão</b>	Não	84 (98,8)	64 (98,5)	1,000*
	Sim	1 (1,2)	1 (1,5)	
	<b>Total</b>	85 (100,0)	65 (100,0)	
<b>Sintomatologia</b>	Febre	Não	70 (82,4)	0,210**
		Sim	15 (17,6)	
	Diarreia	Não	68 (80,0)	
		Sim	17 (20,0)	
		<b>Total</b>	85 (100,0)	
	Dores abdominais	Não	44 (51,8)	
		Sim	41 (48,2)	
		<b>Total</b>	85 (100,0)	
	Vômitos	Não	76 (89,4)	
		Sim	9 (10,6)	
		<b>Total</b>	85 (100,0)	
	Dor de cabeça	Não	62 (72,9)	
		Sim	23 (27,1)	
		<b>Total</b>	85 (100,0)	
<b>Tratamento antiparasitário</b>	Não	54 (63,5)	37 (56,9)	0,500*
	Sim	31 (56,7)	28 (43,1)	
	<b>Total</b>	85 (100,0)	65 (100,0)	

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos; \*\*Foi utilizado o teste estatístico do Qui-quadrado de Pearson para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos.